

# **Entwicklung einer Proteasomen-basierten Polyepitop-Plasmid-Vakzine am Beispiel des Tumor-assoziierten Antigens MUC1**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr.rer.nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Gesa Hoffmann

geboren am 08.03.1975 in Koblenz

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter:    1. Prof. Dr. P.-M. Kloetzel  
                  2. Prof. Dr. W. Uckert  
                  3. PD Dr. U Steinhoff

Tag der mündlichen Prüfung:        08. Dezember 2004

## Abstrakt

Peptide aus intrazellulären Pathogenen sowie Tumorantigene aus mutierten oder überexprimierten Proteinen werden MHC I-restringiert auf der Oberfläche von Mammaliazellen präsentiert und dabei von cytotoxischen T-Lymphozyten erkannt. Die Peptidgenerierung erfolgt vorwiegend durch das Ubiquitin/26S Proteasomensystem, das eine zentrale Rolle bei der antitumoralen Immunantwort spielt. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Polyepitopvakzine in Form von Plasmid-DNA entwickelt und auf ihre Effizienz untersucht. Als Modellantigen diente MUC1, ein von verschiedenen Adenokarzinomen und hämatologischen Tumoren überexprimiertes Glykoprotein. Ein aus dem MUC1-Protein bekanntes HLA-A2.1-abhängiges Epitop wurde als Polyepitop in verschiedenen Variationen synthetisiert, einer 20S proteasomalen *in vitro* Degradation unterzogen und seine Verdauprodukte massenspektrometrisch analysiert. Als optimale Sequenz für die Prozessierung des Polyepitops in die gewünschten Einzelepitope erwies sich deren einfache Verknüpfung ohne intervenierende Sequenzen. Zur Untersuchung des Effekts einer Ubiquitininfusion auf die Stabilität des MUC1-Polyepitops wurden anschließend verschiedene Strategien der linearen Fusion von Ubiquitin an das Polyepitop innerhalb eines Plasmids getestet. Durch transiente Transfektion der Plasmide konnte die Stabilität ihrer Translationsprodukte mittels Immunoblotanalysen quantifiziert werden. Die Ergebnisse demonstrieren, daß das Polyepitop durch die N-terminale Fusion von Wildtyp-Ubiquitin am effizientesten degradiert wird, wobei eine Polyubiquitinierung nicht stattzufinden scheint. Die Auswertung der folgenden *in vitro* Cytotoxizitätsassays sowie der Immunisierungsstudien wurde durch die schwache Affinität des gewählten subdominanten MUC1-Epitops zum HLA-A2.1-Komplex beeinträchtigt. Die vorliegende Arbeit unterstreicht die Bedeutung einer umfassenden Analyse intra- und extrazellulärer Vorgänge bei der Entwicklung einer Plasmidvakzine unter Verwendung subdominanter Epitope.

Proteasom, Polyepitop, Plasmid, Vakzine, MUC1.

## Abstract

Peptides from intracellular pathogens as well as tumor antigens from mutated or overexpressed proteins are presented in an MHC class I restricted manner on the surface of mammalian cells and are thereby recognized by cytotoxic T lymphocytes. Peptide generation is mainly carried out by the ubiquitin/26S proteasome system which plays a crucial role in the antitumor immune response. In the present study, a polyepitope vaccine was generated in the form of plasmid DNA and analyzed for its efficiency. As model antigen MUC1, a glycoprotein overexpressed in various adenocarcinomas and hematological tumors, was used. A known HLA-A2.1 restricted epitope from the MUC1 protein was synthesized as a polyepitope in different variations, subjected to a 20S proteasomal *in vitro* degradation, and its digestion products were analyzed by means of mass spectrometry. The optimal sequence for the processing of the polyepitope into the desired single epitopes was shown to be their simple conjunction without spacer sequences. Different strategies of linear fusion of ubiquitin to the polyepitope within a plasmid were subsequently tested to analyze the effect of ubiquitin fusion on the stability of the MUC1 polyepitope. After transient transfection of the plasmids, the stability of their translation products was quantified by means of immunoblot analyses. The results demonstrate that the polyepitope is degraded most efficiently through N-terminal fusion of wild type ubiquitin, while a polyubiquitination does not seem to occur. The evaluation of the subsequent *in vitro* cytotoxicity assays and immunization studies was impaired by the low affinity of the selected subdominant MUC1 epitope to the HLA-A2.1 complex. The present study emphasizes the importance of an extensive analysis of intra- and extracellular processes when generating a plasmid vaccine using subdominant epitopes.

Proteasome, polyepitope, plasmid, vaccine, MUC1.

# Inhaltsverzeichnis

Abstrakt .....	2
Zusammenfassung .....	6
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>8</b>
1.1 Antigenerkennung durch T-Lymphozyten .....	8
1.1.1 MHC Klasse I-Peptid-Komplexe .....	9
1.1.2 Weg antigener Peptide vom Cytosol an die Zelloberfläche .....	10
1.2 Das Ubiquitin / Proteasomensystem .....	11
1.2.1 Das 20S Proteasom und seine Regulatoren .....	12
1.2.2 Der Ubiquitin-Signalweg .....	15
1.3 Tumor-assoziierte Antigene .....	18
1.3.1 Das Tumorantigen hTERT .....	19
1.3.2 Das Tumorantigen MUC1 .....	20
1.4 Tumorimmunisierung mit Plasmid-DNA .....	21
1.5 Das transgene Mausmodell HHD .....	23
1.6 Zielsetzung .....	24
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>26</b>
2.1 Material .....	26
2.1.1 Geräte .....	26
2.1.2 Chemikalien, Lösungen, Verbrauchsmaterialien .....	26
2.1.3 Kits .....	28
2.1.4 Oligonukleotide .....	29
2.1.5 Plasmide .....	29
2.1.6 Antikörper .....	29
2.1.7 Enzyme .....	29
2.1.8 Peptide .....	30
2.2 Methoden .....	31
2.2.1 Molekularbiologische Methoden .....	31
2.2.1.1 Amplifikation von DNA durch PCR .....	31
2.2.1.2 DNA-Agarosegelelektrophorese .....	31
2.2.1.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel .....	32
2.2.1.4 Bestimmung der DNA-Konzentration .....	32
2.2.1.5 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen .....	32
2.2.1.6 Dephosphorylierung von DNA .....	32
2.2.1.7 Herstellung doppelsträngiger DNA aus Oligonukleotiden .....	32
2.2.1.8 Ligation von Insert-DNA in Plasmid-DNA .....	32
2.2.1.9 Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen .....	32
2.2.1.10 Transformation von <i>E.coli</i> mit Plasmid-DNA .....	33
2.2.1.11 TOPO-Klonierung .....	33
2.2.1.12 Plasmid-Isolation aus <i>E.coli</i> .....	33
2.2.1.13 DNA-Sequenzierung .....	33
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden .....	34
2.2.2.1 Zellyse .....	34
2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	34
2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	34
2.2.2.4 Coomassiefärbung von SDS-Minigelen .....	34
2.2.2.5 Elektrotansfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulose .....	35
2.2.2.6 Identifizierung von Proteinen mittels Immunodetektion .....	35
2.2.2.7 Aufreinigung von 20S Proteasomen .....	35
2.2.2.8 Proteaseassay mit fluorogenen Substraten .....	36
2.2.2.9 Durchführung und Analyse proteolytischer Verdaus .....	36
2.2.3 Zellkultur .....	37
2.2.3.1 Zellen .....	37

2.2.3.2	Zellkulturmedien .....	37
2.2.3.3	Kultur .....	37
2.2.3.4	Einfrieren und Auftauen .....	38
2.2.3.5	Elektroporation von Plasmid-DNA .....	38
2.2.3.6	Test der Plasmid-Transfektanten mittels Fluoreszenzmikroskopie .....	38
2.2.4	Immunologische Methoden .....	38
2.2.4.1	Immunfluoreszenzfärbung von Zellen für die FACS-Analyse .....	38
2.2.4.2	MHC-Peptid-Bindungsassay .....	38
2.2.4.2.1	Bestimmung der Affinität eines Peptids an HLA-A2.1 .....	38
2.2.4.2.2	Bestimmung der Stabilität der HLA-A2.1-Peptid-Bindung .....	39
2.2.4.3	HHD-Mausmodell .....	39
2.2.4.4	Gewinnung MUC1-spezifischer cytotoxischer T-Zellen aus HHD-Mäusen .....	39
2.2.4.4.1	Immunisierung von HHD-Mäusen .....	39
2.2.4.4.2	Kultivierung cytotoxischer T-Zellen .....	40
2.2.4.4.3	Klonierung cytotoxischer T-Zellen .....	40
2.2.4.5	Cytotoxizitätsassay .....	40
2.2.4.6	Immunisierung von HHD-Mäusen mit Plasmid-DNA .....	41
2.2.4.7	Maus IFN $\gamma$ Sekretionsassay .....	41
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>42</b>
3.1	Proteasomale <i>in vitro</i> Prozessierung synthetischer Polyepitope .....	42
3.1.1	Entwurf verschiedener Polyepitope aus Tumor-assoziierten Antigenen .....	42
3.1.2	20S proteasomale <i>in vitro</i> Degradation der Polyepitope .....	43
3.2	Proteasomale <i>in vivo</i> Prozessierung Ubiquitin-fusionierter Polyepitope .....	49
3.2.1	Herstellung von Plasmiden für Ubiquitin-fusionierte MUC1-Polyepitope .....	49
3.2.2	Funktionsanalyse eines MUC1-spezifischen Antikörpers .....	52
3.2.3	Untersuchung der zellulären Polyepitop-Degradation .....	54
3.3	MHC Klasse I-restringierte Präsentation des MUC1-Epitops .....	62
3.3.1	Generierung von Zielzellen für einen Cytotoxizitäts-Assay .....	62
3.3.2	Generierung eines MUC1-spezifischen CTL-Klons aus HHD-Mäusen .....	63
3.3.3	MHC-Bindung und -Stabilisierung der Tumorepitope .....	66
3.4	<i>In vivo</i> CTL-Induktion nach Plasmid-Immunisierung von HHD-Mäusen .....	69
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>72</b>
4.1	<i>In vitro</i> 20S Degradation von Polyepitopen .....	72
4.1.1	Defiziente Degradation der hTERT-Polyepitope .....	72
4.1.2	Effiziente Generierung und niedrige MHC Klasse I-Affinität der MUC1-Epitope .....	76
4.1.3	Ausblick: Das duale Proteasomen-Modell .....	77
4.2	Ubiquitin-Fusionskonstrukte – Verbesserung des proteasomalen Abbaus? .....	79
4.2.1	Konstrukt 5 ohne Ubiquitin – kein proteasomales Substrat .....	79
4.2.2	Konstrukte 1 und 3 – Deubiquitinierung und N-End-Regel .....	80
4.2.3	Konstrukt 2 – der UFD-Signalweg .....	82
4.2.4	Konstrukt 4 – C-terminale Ubiquitininfusion .....	84
4.2.5	Ausblick: Aspekte der N-terminalen Monoubiquitininfusion beim proteasomalen Substratabbau .....	86
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>99</b>
	Abkürzungen .....	99
	Publikationen .....	100
	Danksagung .....	101
	Erklärung .....	102

## ZUSAMMENFASSUNG

Peptide aus intrazellulären Antigenen werden MHC Klasse I-restringiert auf der Oberfläche von Mammaliazellen präsentiert. Auch Tumorantigene aus mutierten oder überexprimierten Proteinen werden auf diese Weise präsentiert und dadurch von cytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) erkannt. Die Peptidgenerierung erfolgt vorwiegend durch das Ubiquitin / 26S Proteasomensystem, das somit eine zentrale Rolle in der zellulären antitumoralen Immunantwort spielt. Eine mögliche tumorale Immuntoleranz kann durch den Einsatz von Vakzinen durchbrochen werden, die auf der Basis von Tumorantigenen spezifische CTLs aktivieren sollen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Polyepitop-Vakzine in Form von Plasmid-DNA entwickelt und auf ihre Effizienz untersucht. Als Modell-Tumorantigen wurde MUC1 gewählt, ein von verschiedenen Adenokarzinomen und hämatologischen Tumoren überexprimiertes Glykoprotein. Ein aus dem MUC1-Protein bekanntes HLA-A2.1-abhängiges Epitop wurde zunächst in verschiedenen Variationen als Polyepitop synthetisiert und einer 20S proteasomalen *in vitro* Degradation unterzogen. Die Identität der entstandenen Fragmente wurde mittels Massenspektrometrie analysiert und somit die optimale Sequenz für die Prozessierung des Polyepitops in die gewünschten Einzelepitope ermittelt. Im Fall des MUC1-Epitops stellte sich die einfache Verknüpfung der Epitope ohne intervenierende Sequenzen als geeignetste Variante heraus. Angesichts neuerer Hinweise auf die Funktion freier 20S Proteasomen bei der Antigenprozessierung *in vivo* unterstreichen diese Analysen die Notwendigkeit, vor der Herstellung einer Polyepitop-Vakzine die proteasomale Epitopgenerierung anhand synthetischer Peptide *in vitro* zu überprüfen.

Die lineare Fusion von Ubiquitin an ein Substrat beschleunigt dessen proteasomale Degradation und kann somit die MHC Klasse I-restringierte Präsentation der generierten Epitope begünstigen. Unterschiedliche Ubiquitininfusions-Strategien üben in Abhängigkeit des gewählten Substrats verschiedene Effekte auf die Stabilität des Fusionskonstrukts aus. Die in der vorliegenden Arbeit hergestellte Plasmidvakzine codiert für die MUC1-Polyepitop-Sequenz in Fusion mit der Sequenz für Ubiquitin in vier N- und C-terminalen Varianten. Jedes Plasmid wurde zusätzlich mit der Sequenz für GFP versehen. Durch transiente Transfektion der Plasmide konnte die Stabilität ihrer Translationsprodukte mittels Immunoblotanalysen quantifiziert werden. Die experimentellen Daten demonstrieren, daß das Polyepitop sowohl allein als auch in Kombination mit GFP durch die N-terminale Fusion von nicht-mutiertem Ubiquitin am effizientesten proteasomal degradiert wird. Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß zur Degradation eines proteasomalen Substrats die lineare Monoubiquitin-Fusion ausreicht und keiner Polyubiquitinierung bedarf.

Die Untersuchung Plasmid-transfizierter Zellen mittels eines *in vitro* Cytotoxizitäts-Assays sollte dem Nachweis dienen, daß die verstärkte Prozessierung eines ubiquitinierten Polyepitops auch zu einer erhöhten MHC Klasse I-Präsentation der Epitope und deren Erkennung durch CTLs führt. Es wurde daher in der vorliegenden Arbeit ein MUC1-spezifischer CTL-Klon generiert, der zur Quantifizierung der Epitopräsentation auf Plasmid-transfizierten Zellen eingesetzt werden sollte. Der Klon erwies sich jedoch als instabil und konnte für die vorgesehenen Cytotoxizitäts-Assays nicht verwendet werden. Die Komplikationen bei der Kultur des CTL-Klons spiegeln die schwache Affinität des gewählten MUC1-Epitops an den HLA-A2.1-Komplex wider.

Die folgende immunologische Untersuchung sollte dem Vergleich der verschiedenen Plasmide hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur *in vivo* Induktion einer spezifischen CTL-Antwort durch Plasmid-Immunisierung dienen. Das hierfür verwendete Mausmodell „HHD“ ist transgen für das humane HLA-A2.1 bei gleichzeitiger Deletion der murinen MHC Klasse I-Moleküle und eignet sich daher besonders zur Analyse HLA-A2.1-spezifischer CTL-Antworten. Die Quantifizierung der murinen CTL-Antwort auf die Plasmid-Immunisierung erfolgte mittels eines IFN $\gamma$ -Sekretions-Assays. In Analogie zu den zuvor beschriebenen technischen Schwierigkeiten beim Einsatz eines niedrig-affinen, subdominanten Tumorepitops konnte kein verlässlicher Nachweis der CTL-Induktion durch eines der Plasmide erbracht werden. Die vorliegende Arbeit unterstreicht die Bedeutung einer umfassenden Analyse intra- und extrazellulärer Vorgänge bei der Entwicklung einer Plasmid-Vakzine unter Verwendung subdominanter Epitope.

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 ANTIGENERKENNUNG DURCH T-LYMPHOZYTEN

Die adaptive Immunantwort beruht auf der Aktivität von B- und T-Lymphozyten. Diese sind für die lebenslange Immunität verantwortlich, die als Folge einer Erkrankung oder einer Vakzinierung entstehen kann. B-Lymphozyten differenzieren nach ihrer Aktivierung zu Plasmazellen, die Antikörper freisetzen. T-Lymphozyten bilden zwei funktionell verschiedene Klassen, die anhand ihrer Oberflächenmarker CD4 und CD8 unterschieden werden. CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen dienen in erster Linie der Aktivierung anderer Immunzellen, während CD8<sup>+</sup> cytotoxische T-Zellen (CTLs, *cytotoxic T lymphocytes*) Pathogen-infizierte Zellen sowie Tumorzellen beseitigen. Die protektiven Funktionen von T-Lymphozyten basieren auf ihrer Fähigkeit, Peptidfragmente zu erkennen, welche von Proteinen eines Erregers oder Tumors stammen. Diese Peptide entstehen durch die Prozessierung eines intakten Antigens und werden anschließend auf der Oberfläche der betroffenen Zelle präsentiert. T-Lymphozyten vollziehen die Antigenerkennung durch die hochspezifische Wechselwirkung ihres T-Zell-Rezeptors mit dem Antigen im Kontext mit sogenannten MHC-Molekülen (*major histocompatibility complex*), von denen zwei Klassen existieren: MHC Klasse I-Moleküle werden von allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert und interagieren mit dem T-Zell-Rezeptor von CD8<sup>+</sup> CTLs. MHC Klasse II-Moleküle hingegen finden sich fast ausschließlich auf der Oberfläche professioneller Antigen-präsentierender Zellen (APCs, *antigen presenting cells*) und treten mit dem T-Zell-Rezeptor von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in Wechselwirkung.

Die Erkennung MHC Klasse I- und II-präsentierender Zellen durch die beiden funktionell verschiedenen Klassen von T-Lymphozyten reflektiert die physiologische Funktion dieser Interaktion: Mikroorganismen und ihre Produkte in den vesikulären Kompartimenten professioneller APCs werden in Lysosomen proteolytisch prozessiert. In diesem vesikulären System erfolgt auch die Bindung der generierten Peptide an MHC Klasse II-Moleküle. Die anschließende Erkennung der betroffenen APC durch CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen dient der APC-Aktivierung und der Beseitigung des Pathogens. Im Gegensatz dazu erfolgt die Prozessierung cytosolisch lokalisierter Proteine in erster Linie durch das Ubiquitin / Proteasomensystem. Die generierten Peptide werden durch TAP (*transporter associated with antigen processing*) ins Lumen des endoplasmatischen Reticulums (ER) befördert, assoziieren hier mit MHC Klasse I-Molekülen und gelangen über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche. Alle Körperzellen, die mit Viren oder cytosolischen Bakterien infiziert sind oder maligne Eigenschaften besitzen, können dadurch von CD8<sup>+</sup> CTLs vernichtet werden, so daß die Möglichkeit besteht, eine Infektion zu beseitigen bzw. die Entstehung eines Tumors zu unterbinden. Die beiden unterschiedlichen Mechanismen der Antigenprozessierung und



-präsentation gewährleisten die Aktivierung geeigneter T-Lymphozyten als adäquate Reaktion auf ein bestimmtes Antigen (Janeway 2002).

### 1.1.1 MHC Klasse I-Peptid-Komplexe

MHC Klasse I-Moleküle bestehen aus einer transmembranen  $\alpha$ -Kette, die nichtkovalent mit dem  $\beta_2$ -Mikroglobulin ( $\beta_2$ M) assoziiert ist. Die  $\alpha$ -Kette läßt sich in drei Domänen einteilen, von denen eine ( $\alpha_3$ ) mit dem CD8-Corezeptor des T-Zell-Rezeptorkomplexes interagiert, während  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  der Peptidbindung dienen. Sie bilden eine Peptidbindungsfurche aus zwei seitlich angeordneten  $\alpha$ -Helices, die auf einem Faltblatt aus acht antiparallelen  $\beta$ -Strängen liegen (Abb.1). Es existieren drei Hauptgene für MHC Klasse I, welche beim Menschen als HLA-A, -B und -C (*human leukocyte antigen*) und bei der Maus als H2-K, -D und -L bezeichnet werden. Aufgrund der codominanten Expression verfügt jedes Individuum daher über bis zu sechs verschiedene MHC Klasse I-Moleküle. Die Produkte einzelner MHC-Allele können sich in bis zu 20 Aminosäuren voneinander unterscheiden, wobei die meisten dieser Differenzen in der peptidbindenden Furche liegen. Dies gewährleistet die Präsentation einer Vielzahl an unterschiedlichen Peptiden. Neben der Polygenie zeichnen sich die MHC-Gene durch einen sehr stark ausgeprägten Polymorphismus aus. Einige der Allele sind in bestimmten Populationen besonders häufig vertreten, wie zum Beispiel HLA-A2.1 mit über 50% in der kaukasischen Bevölkerung.

MHC Klasse I-bindende Peptide sind durchschnittlich acht bis zehn Aminosäuren lang (Rammensee *et al.* 1995). Das Rückgrat eines gebundenen Peptids interagiert durch eine Reihe von Wasserstoffbrücken und ionischen Wechselwirkungen an beiden Termini des Peptids mit invarianten Bereichen der MHC Klasse I-Bindungsfurche. Zusätzlich besitzen die Peptide, die mit einer bestimmten MHC Klasse I-Variante assoziieren, an zwei oder drei definierten Positionen innerhalb ihrer Sequenz dieselben oder sehr ähnliche Aminosäurereste, welche als Ankerreste bezeichnet werden (Abb.1). Die Aminosäureseitenketten an diesen Positionen interagieren mit den polymorphen MHC-Bereichen der Bindungsfurche. Die meisten MHC Klasse I-bindenden Peptide tragen einen hydrophoben oder basischen Ankerrest am C-Terminus (Ortmann *et al.* 1997). Für HLA-A2.1 stellen Leucin an Position P2 und Valin an P9 des Peptids die Ankerreste dar. Sogenannte sekundäre Ankerreste können ebenfalls einen positiven Einfluß auf die MHC-Peptid-Bindung ausüben. Diese sind für HLA-A2.1 durch Methionin an P2, Valin an P6 und Leucin an P9 definiert (Rammensee *et al.* 1995). Die Gruppe primärer und sekundärer Ankerreste, welche die Bindung an ein bestimmtes MHC Klasse I-Molekül erlauben, wird als Sequenzmotiv bezeichnet. Dieses Motiv ermöglicht das Auffinden potentiell an ein MHC Klasse I-Molekül bindender Peptide innerhalb eines antigenen Proteins. Sequenzmotive spielen daher eine wichtige Rolle bei der Entwicklung Peptid-basierter Vakzine. Die Methode der „reversen Immunologie“ basiert auf

der Suche nach bekannten HLA-Ankerresten und klassifiziert 9mer-Peptide entsprechend ihrer theoretischen Dissoziations-Halbwertszeit.

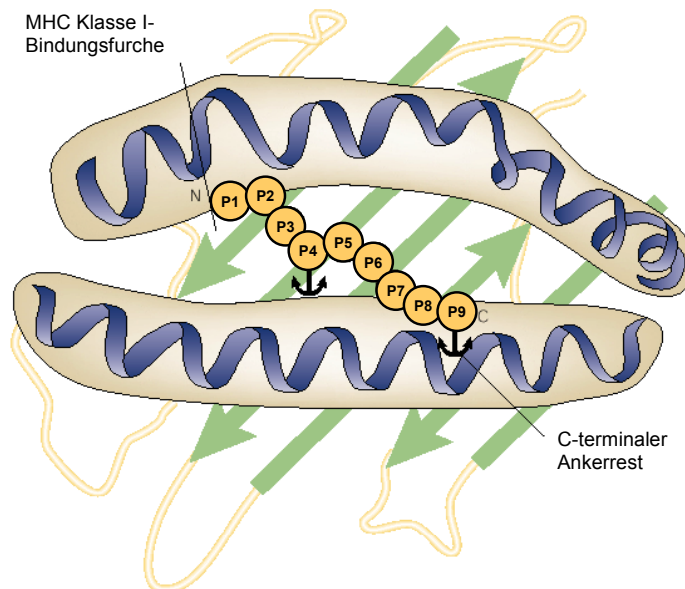


Abb. 1: MHC Klasse I-Peptidbindung. Ein antigenes Peptid aus neun Aminosäuren assoziiert über seine Ankerreste an den Positionen P4 und P9 an die MHC Klasse I-Bindungsfurche (Abb. nach Kloetzel 2001).

### 1.1.2 Weg antigener Peptide vom Cytosol an die Zelloberfläche

Das 26S Proteasom erkennt Substrate, die mit einer Ubiquitinkette als Degradationssignal markiert sind. Es ist insbesondere für die Generierung des korrekten C-Terminus von MHC Klasse I-abhängigen Peptiden verantwortlich (vgl. Abschnitt 1.2). Daneben spielen nach neueren Untersuchungen weitere Proteasen eine wichtige Rolle bei der Antigenprozessierung. Diese Aminopeptidasen sind für das *trimming* N-terminal elongierter Vorläuferpeptide verantwortlich (Kloetzel 2004). Beispiele hierfür sind die Leucinaminopeptidase, die Puromycin-sensitive Aminopeptidase, die Bleomycinhydrolase und die Tripeptidylpeptidase-II, welche im Cytosol lokalisiert sind, sowie die ER-ständigen Aminopeptidasen ERAP1 und L-RAP (Rock *et al.* 2004). Cytosolisch generierte Peptide bzw. ihre Vorläufer werden von TAP ins Lumen des ER transportiert. TAP ist ein Heterodimer aus den Untereinheiten TAP1 und TAP2 und gehört zur Familie der ATP-abhängigen ABC-Membrantransporter (*ATP binding cassette*). Da TAP bevorzugt Peptide mit einer Länge von acht bis zwölf Aminosäuren und hydrophobem bzw. basischem C-Terminus transportiert (Shepherd *et al.* 1993), stimmen die grundlegenden Bindungsspezifitäten der MHC Klasse I-Moleküle mit denen des TAP-Transporters überein. ER-seitig ist TAP mit einem Komplex aus einem partiell gefalteten MHC Klasse I-Molekül und Chaperonen assoziiert. Erst die Bindung eines Peptids führt zur vollständigen Faltung und Stabilisierung von MHC Klasse I und seinem

Transport über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche, wo eine spezifische Interaktion mit dem T-Zell-Rezeptorkomplex von CTLs erfolgen kann (Abb.2).

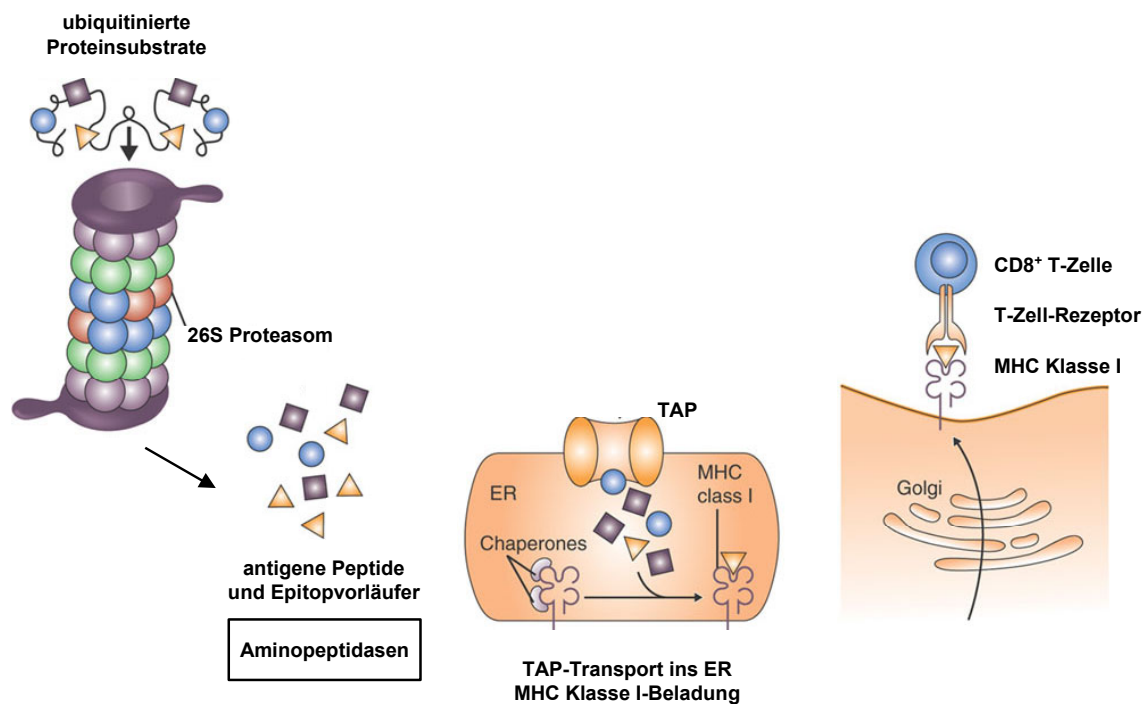


Abb. 2: Modell der MHC Klasse I-restringierten Antigenprozessierung und -präsentation. In der Regel werden Substrate, die MHC Klasse I-Epitope enthalten, mit einer Ubiquitinkette versehen, die als 26S Degradationssignal dient. Die Prozessierung eines Substrats führt zur Generierung kleiner Peptide, die durch TAP ins ER transportiert werden. N-terminal verlängerte Peptide werden einem trimming durch cytosolische oder ER-lokalisierte Aminopeptidasen unterzogen. Im ER binden die Peptide an Chaperon-assoziierte MHC Klasse I-Moleküle. Vollständig gefaltete und beladene MHC Klasse I-Moleküle werden über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert. Durch die spezifische Bindung eines T-Zell-Rezeptors an seinen komplementären MHC-Peptid-Komplex kommt es zur Aktivierung des cytotoxischen T-Lymphozyten (Abb. nach Kloetzel 2004).

## 1.2 DAS UBIQUITIN / PROTEASOMENSYSTEM

Die Ubiquitin / Proteasomen-abhängige Proteolyse dient in allen Zellen der Regulation des Protein-Turnovers und ist damit an vielen lebenswichtigen Prozessen wie Transkription, Zellzyklus, Signaltransduktion, Differenzierung und Apoptose beteiligt (Hershko and Ciechanover 1998). Sie trägt außerdem zur Degradation mißgefalteter Proteine bei (Finley *et al.* 1987), die als DRiPs (*defective ribosomal products*) bezeichnet werden und die Hauptquelle proteasomaler Substrate darstellen (Schubert *et al.* 2000). In Vertebraten spielt das Proteasom eine entscheidende Rolle bei der Generierung MHC Klasse I-restringierter Peptide (Goldberg *et al.* 2002). Es prozessiert neben Proteinen cytoplasmatischer Pathogene auch zelleigene Proteine einschließlich der Tumorantigene. Daher ist das Ubiquitin / Proteasomensystem bei einer Vielzahl an pathologischen Prozessen wie Entzündung,

Autoimmunität, neurodegenerativen Erkrankungen und malignen Entartungen von entscheidender Bedeutung (Ciechanover and Schwartz 2002).

### 1.2.1 Das 20S Proteasom und seine Regulatoren

Das 26S Proteasom besteht aus einem zentralen, proteolytisch aktiven 20S Kernkomplex und zwei peripheren 19S Regulatoren (Peters *et al.* 1993). Der 19S Regulator ist aus den beiden großen Komponenten *base* und *lid* aufgebaut (Abb.3). Während *base* mit seinen sechs ATPase-Untereinheiten Chaperon-ähnliche Aktivität besitzt (Braun *et al.* 1999), ist die Funktion von *lid* noch nicht eindeutig geklärt. Generell erkennt der 19S Regulator Proteinsubstrate, die durch die kovalente Anheftung von Ubiquitinketten gekennzeichnet sind (Deveraux *et al.* 1994), und dient ihrer Deubiquitinierung, Entfaltung und Translokation in den Kernkomplex (Laney and Hochstrasser 1999).

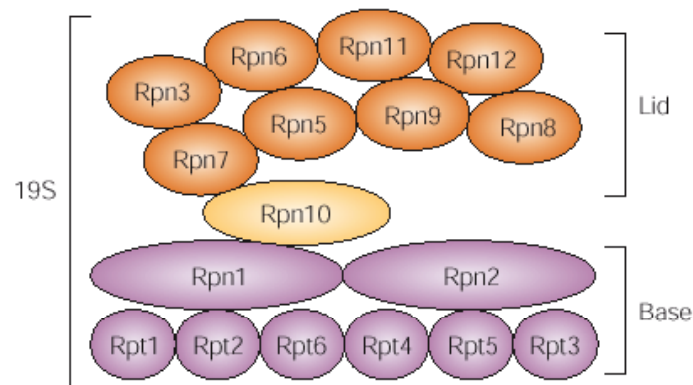


Abb. 3: Struktur des 19S Regulators in *Saccharomyces cerevisiae*. Der *lid* Komplex (orange) besteht aus acht Nicht-ATPase-Untereinheiten, die Untereinheit Rpn10 (gelb) ist zwischen den beiden Komplexen angeordnet, und der *base* Komplex (violett) beherbergt sechs ATPase- und zwei Nicht-ATPase-Untereinheiten. Rpn: *regulatory particle non-ATPase*; Rpt: *regulatory particle ATPase* (Abb. nach Pickart 2004).

Das 20S Proteasom mit einem Molekulargewicht von 700 kDa weist eine zylinderförmige Struktur mit drei inneren Kammern auf (Lowe *et al.* 1995). Der Komplex besteht aus zwei identischen, heptameren äußeren  $\alpha$ -Ringen ( $\alpha 1$ - $\alpha 7$ ) und zwei identischen, heptameren inneren  $\beta$ -Ringen ( $\beta 1$ - $\beta 7$ , Abb.4) (Groll *et al.* 1997). Die beiden  $\alpha$ -Ringe bilden das sogenannte *gate* und kontrollieren den Zugang zu den inneren Kavitäten (Groll *et al.* 2000). Dieser ist in biochemisch isoliertem 20S häufig verschlossen, so daß sich das Proteasom in einem latenten Zustand befindet. Die Latenz kann *in vitro* durch die Behandlung mit SDS oder Poly-L-Lysin aufgehoben werden, wobei wahrscheinlich die Interaktion mit den flexiblen N-Termini der  $\alpha$ -Untereinheiten zu einer Konformationsänderung und Öffnung des *gates* führt.

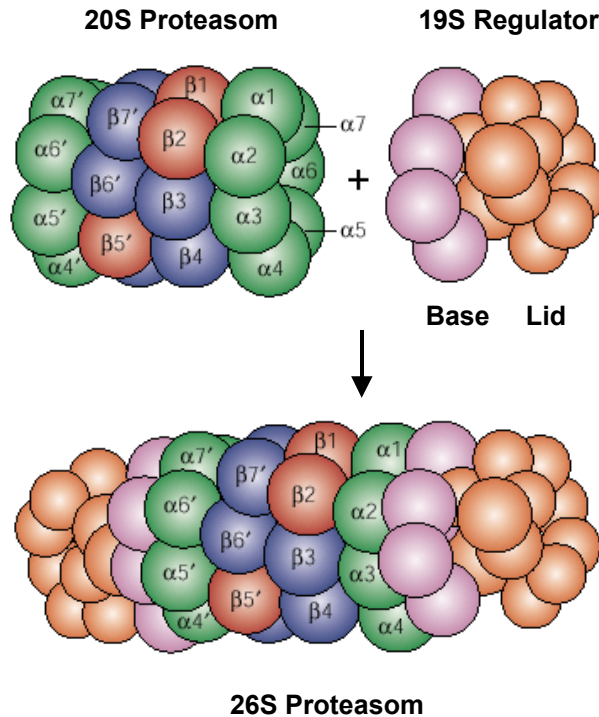


Abb. 4: Aufbau des 26S Proteasoms aus dem 20S Kernkomplex und zwei 19S Regulatoren. Das 20S Proteasom besteht aus 28 Untereinheiten, die in vier heptameren Ringen zusammengelagert sind. Die beiden äußeren Ringe enthalten die  $\alpha$ -Untereinheiten ( $\alpha 1$ - $\alpha 7$ , grün), deren Aminotermi in die zentrale Öffnung des Zylinders ragen. Die beiden inneren Ringe enthalten jeweils eine Kopie der  $\beta$ -Untereinheiten ( $\beta 1$ - $\beta 7$ , blau und rot), von denen drei ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$ , rot) die aktiven Zentren beherbergen. Der 19S Regulator besteht aus zwei Komponenten. Der *base* Komplex (violett) bindet an die  $\alpha$ -Ringe, während der *lid* Komplex (orange) wahrscheinlich der Substratbindung dient (Abb. nach Kloeetzel 2001).

Die proteolytische Aktivität des Proteasoms wird durch die drei Untereinheiten  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$  ausgeübt, deren N-terminale Threonin-Hydrolasen in den Innenraum des Zylinders ragen (Baumeister *et al.* 1998). Mit Hilfe kurzer fluorogener Peptidsubstrate wurden den katalytischen Untereinheiten bestimmte Präferenzen der peptidspaltenden Hydrolyse zugeschrieben. Sie üben die Proteolyse mit Caspase-, Trypsin- bzw. Chymotrypsin-ähnlicher Aktivität aus und spalten damit bevorzugt nach sauren ( $\beta 1$ ), basischen ( $\beta 2$ ) bzw. hydrophoben ( $\beta 5$ ) Resten. Der Abbau längerer, physiologischer Peptidsubstrate ist durch eine stärkere Komplexität charakterisiert und lässt sich nicht eindeutig und spezifisch den verschiedenen Untereinheiten zuordnen (Kisselev *et al.* 1999). Generell lässt sich jedoch festhalten, daß das Proteasom durch den bevorzugten Schnitt nach hydrophoben und basischen Resten solche Peptide generiert, deren C-Termi besonders effizient mit TAP- und MHC Klasse I-Molekülen interagieren (Boes *et al.* 1994; Niedermann *et al.* 1995; Ossendorp *et al.* 1996). Die Effizienz dieser Spaltreaktion hängt nicht nur von der C-terminalen Aminosäure selbst, sondern auch von der umgebenden Sequenz sowohl innerhalb des Epitops (Kraft *et al.* 1998; Shimbara *et al.* 1998) als auch Epitop-flankierend ab (Bachmair *et al.* 1986; Beekman *et al.* 2000; Nussbaum *et al.* 1998; Theobald *et al.* 1998). So wird z.B. die Spaltung durch kleine

Aminosäuren wie Glycin oder Alanin C-terminal unterstützt (Nussbaum *et al.* 1998). Die Generierung des N-Terminus eines Epitops ist weniger klar definiert und wird in vielen Fällen nicht vom Proteasom durchgeführt. Stattdessen können N-terminal elongierte Vorläuferpeptide entstehen. Diese werden entweder einem *trimming* durch cytosolische Aminopeptidasen unterzogen oder im Anschluß an ihren TAP-Transport (Neeffjes *et al.* 1995; van Endert *et al.* 1995) von ER-ständigen Peptidasen zur korrekten Länge prozessiert (Saric *et al.* 2002; York *et al.* 2002). Der Abbau eines Proteins durch verschiedene Proteasen weist darauf hin, daß die Epitopgenerierung keinen effizienten zellulären Prozeß darstellt. Demgemäß wurde in einer neuen Untersuchung gezeigt, daß zur Präsentation eines Epitops 500-3000 Proteine degradiert werden müssen (Princiotta *et al.* 2003).

Unter dem Einfluß von Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), einem im Zuge einer Immunreaktion sezernierten Cytokin, wird die Expression einiger Komponenten des Antigen-präsentierenden Systems induziert. Hierzu zählen neben dem Peptidtransporter TAP, der  $\alpha$ -Kette von MHC Klasse I-Molekülen und dem  $\beta$ 2-Mikroglobulin auch die proteasomalen Immununtereinheiten  $\beta$ 1i,  $\beta$ 2i und  $\beta$ 5i. Sie ersetzen bei der *de novo* Synthese von Proteasomen die katalytischen  $\beta$ -Untereinheiten und führen zur Bildung sogenannter Immunoproteasomen (Frentzel *et al.* 1994). Die Caspase-ähnliche Aktivität ist in Immunoproteasomen im Vergleich zu konstitutiven Proteasomen durch den  $\beta$ 1 $\rightarrow$  $\beta$ 1i-Austausch deutlich reduziert (Gaczynska *et al.* 1994; Kuckelkorn *et al.* 1995). Die Auswirkungen der beiden anderen Immununtereinheiten auf die Spaltspezifität lassen sich insbesondere bei längeren Peptidsubstraten nicht eindeutig definieren (Nussbaum *et al.* 1998; Schmidtke *et al.* 1997). Generell zeichnen sich Immunoproteasomen durch eine veränderte Schnittstellenpräferenz aus und verbessern in vielen Fällen die Generierung und Präsentation immundominanter und insbesondere viraler Epitope (Schwarz *et al.* 2000; Sijts *et al.* 2000). Der Einbau der Immununtereinheiten bewirkt wahrscheinlich geringfügige Konformationsänderungen im 20S Proteasom (Sijts *et al.* 2000). Außerdem deuten kinetische Untersuchungen darauf hin, daß Immunoproteasomen eine „offenere“ Konformation besitzen und Substrate leichter aufnehmen können (Kloetzel 2001).

Zur verbesserten Öffnung des *gates* und damit zur Aktivierung des Proteasoms trägt eine weitere IFN $\gamma$ -induzierbare Komponente des Proteasomensystems bei: Der Proteasomenaktivator PA28 (Dubiel *et al.* 1992; Ma *et al.* 1992) ist ein ebenfalls heptamerer Komplex mit  $\alpha_3\beta_4$ -Stöchiometrie (Knowlton *et al.* 1997), der an die  $\alpha$ -Ringe des 20S Proteasoms binden kann. *In vitro* stimuliert PA28 die 20S proteasomale Hydrolyse von kurzen fluorogenen Peptidsubstraten, indem es vermutlich den Substratzugang oder den Produktaustritt erleichtert (Stohwasser *et al.* 2000). Die Bindung von PA28 scheint Konformationsänderungen in den  $\alpha$ -Untereinheiten des 20S Proteasoms zu induzieren. Neben diesen *gating* Mechanismen beeinflusst PA28 auch den Zugang zu den aktiven Zentren von

20S. Die Expression von PA28 kann unabhängig vom Einbau der 20S Immununtereinheiten zu einer verstärkten Präsentation bestimmter viraler und tumoraler Antigene führen (Groettrup *et al.* 1996; Sijts *et al.* 2002). Unter dem Einfluß von IFN $\gamma$  erhöht die Zelle damit die Menge und Vielfalt ihrer MHC Klasse I-präsentierten Peptide und reagiert auf die Anforderungen einer Immunantwort.

Welchen Einfluß üben IFN $\gamma$ -induzierte Komponenten des Proteasomensystems auf die Generierung von Tumorepitopen aus? Unter normalen physiologischen, d.h. nicht-entzündlichen Bedingungen exprimieren viele Zellen keine Immununtereinheiten und nur wenig PA28 (Soza *et al.* 1997). Gleichzeitig scheint die Expression dieser beiden Komponenten keine Auswirkungen auf andere Funktionen des Proteasoms als die Antigenprozessierung zu haben. Eine mögliche Rolle spielen Immunoproteasomen und PA28 bei der Entwicklung des CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten-Repertoires. So könnte die Expression von Immununtereinheiten in dendritischen Zellen des Thymus zu einer negativen Selektion solcher selbst-reaktiver CTLs führen, die Immunoproteasomen-spezifische Autoantigene erkennen. Morel *et al.* konnten in diesem Zusammenhang zeigen, daß Immunoproteasomen nicht in der Lage sind, einige autoimmune Peptide einschließlich eines Melanozyten-Tumorantigens zu generieren (Morel *et al.* 2000). Andererseits besitzen sogar IFN $\gamma$ -stimulierte dendritische Zellen stets eine Mischpopulation aus konstitutiven Proteasomen und Immunoproteasomen (Macagno *et al.* 1999), so daß davon ausgegangen werden kann, daß diese Zellen zur Bildung verschiedenster Epitope fähig sind. Eine weitere Publikation berichtete von einem TRP2-Tumorepitop, dessen Präsentation in Melan 18a-Zellen nach IFN $\gamma$ -Behandlung abnahm (Sun *et al.* 2002). Aufgrund des Fehlens von Immunoproteasomen in Melan 18a-Zellen kann diese Beobachtung jedoch nicht auf den Einfluß von Immununtereinheiten zurückgeführt werden. Stattdessen besteht die Möglichkeit, daß IFN $\gamma$ -induzierte Aminopeptidasen für diesen Effekt verantwortlich sind. Bislang stammen alle bekannten Autoantigene, deren MHC-Präsentation unter IFN $\gamma$  reduziert ist, aus membranständigen oder vesikulären Proteinen. Es ist daher denkbar, daß ihre Prozessierung durch ER-lokalisierte Aminopeptidasen vollzogen wird. Die Auswirkungen von Immunoproteasomen auf die *in vivo* Generierung von Tumorepitopen sind daher bislang nicht eindeutig geklärt.

### 1.2.2 Der Ubiquitin-Signalweg

Eine wesentliche Voraussetzung für die Selektivität der 26S proteasomalen Degradation stellt die Polyubiquitinierung von Proteinsubstraten dar. Ubiquitin ist ein in Eukaryoten hochkonserviertes globuläres Protein aus 76 Aminosäuren. Es wird im Genom als Fusionsprotein codiert, und zwar sowohl mit weiteren Ubiquitinkopien in einer Tandemstruktur (Finley *et al.* 1987) als auch mit den ribosomalen Untereinheiten L40 und



S27a (Finley *et al.* 1989; Redman and Rechsteiner 1989). Die *in vivo* Prozessierung von Ubiquitin erfolgt cotranslational an seinem C-terminalen Glycinrest G76 (Baker *et al.* 1992).

Die kovalente Anheftung von Ubiquitin an ein Zielprotein ist ein mehrstufiger Prozeß, an dem mindestens drei Enzymgruppen (E1, E2, E3) beteiligt sind (Weissman 2001). Ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym E1 bildet ATP-abhängig eine Thiolesterbindung mit dem C-terminalen Glycin eines freien Ubiquitinmoleküls. Dieses wird anschließend auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym E2 übertragen. Eine Ubiquitin-Ligase E3 katalysiert den Transfer des Ubiquitins von E2 auf die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Substrat-internen Lysins. Bislang wurden zwei große E3-Familien mit konservierten Proteindomänen indentifiziert: HECT-E3s bilden Thiolester-Intermediate mit dem Ubiquitinmolekül (Huibregtse *et al.* 1995), während Ringfinger-E3s den direkten Ubiquitintransfer von E2 auf das Substrat vermitteln (Abb.5) (Joazeiro and Weissman 2000). Der Transfer von mindestens drei weiteren Ubiquitinmolekülen jeweils auf den Lysinrest in Position 48 des vorhergehenden Ubiquitins markiert das Zielprotein durch eine Polyubiquitinkette (Hochstrasser 1996) und dient als Signal zum proteasomalen Abbau (Chau *et al.* 1989).

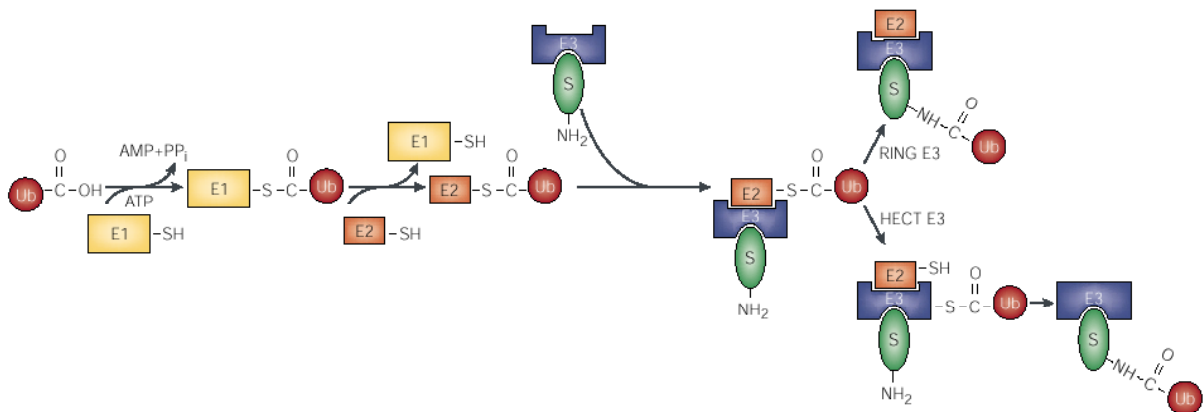


Abb. 5: Der Ubiquitinierungs-Signalweg. Der C-Terminus eines freien Ubiquitinmoleküls wird ATP-abhängig an das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 gebunden. Anschließend wird Ubiquitin auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym E2 übertragen. Das Enzym E2 assoziiert mit einer Ubiquitin-Ligase E3, die bereits ein Substrat gebunden haben kann. Im Fall eines RING E3 wird das Ubiquitin sofort auf sein Substrat übertragen, während ein HECT E3 zunächst mit dem Ubiquitin ein Intermediat bildet, bevor es das Molekül an sein Substrat oder eine Substrat-assoziierte Polyubiquitinkette weiterleitet (Abb. Weissman 2001).

Neben K48 besitzt das Ubiquitinmolekül sechs weitere Lysinreste, die *in vitro* zur Kettenbildung fähig sind. *In vivo* konnten Ketten an den Lysinen 11, 29, 48 und 63 identifiziert werden (Pickart 1997), die funktionell unterschiedliche Auswirkungen auf das Proteinsubstrat haben. So treten z.B. K63-verknüpfte Ubiquitinpolymere im Zusammenhang mit Streßantworten (Arnason and Ellison 1994) und DNA-Reparatur (Spence *et al.* 1995) auf. Eine weitere Modifikation besteht in der Monoubiquitinierung von Substraten. Diese stellt ein Signal für die Endozytose von Proteinen der Plasmamembran und somit deren Abbau in



Vakuolen oder Lysosomen dar. Sie spielt außerdem eine Rolle bei der Histonregulation und der Knospung von Retroviren (Hicke 2001). Bislang schien Monoubiquitin aufgrund seiner ineffizienten *in vitro* Bindung an den 19S Regulator kein quantitativ ausreichendes Signal für den proteasomalen Abbau darzustellen (Thrower *et al.* 2000). Einige Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, daß in bestimmten Fällen die Monoubiquitinierung einschließlich der linearen N-terminalen Ubiquitininfusion den 26S proteasomalen Substratabbau initiieren kann (Eytan *et al.* 1993; Haas *et al.* 1990; Shaeffer and Kania 1995). Eine einzelne Ubiquitinuntereinheit in Fusion mit dem N-Terminus eines Substrats kann entweder als Anker zur Polyubiquitinierung dienen (Johnson *et al.* 1995) oder möglicherweise allein zum 26S proteasomalen Abbau des Substrats beitragen (Chernova *et al.* 2003; Hanna *et al.* 2003).

Die N-terminale Ubiquitinierung von Proteinen wurde neuerdings auch als ein physiologischer Prozeß zur Kennzeichnung proteasomaler Substrate entdeckt. Zu den bislang bekannten Fällen zählen der Transkriptionsfaktor MyoD (Breitschopf *et al.* 1998), das HPV16 Onkoprotein E7 (Reinstein *et al.* 2000), die EBV *latent membrane proteins* LMP1 (Aviel *et al.* 2000) und LMP2A (Ikeda *et al.* 2002), der CDK-Inhibitor p21 (Bloom *et al.* 2003) sowie der Entwicklungs-Regulator Id2 (Fajerman *et al.* 2004). Da sich insbesondere viele virale Proteine durch das Fehlen von Lysinresten auszeichnen, ist es denkbar, daß die N-terminale Ubiquitinierung eine wichtige physiologische Funktion bei der proteasomalen Degradation erfüllt.

In Analogie zur Phosphorylierung ist auch die Ubiquitinierung ein dynamischer und reversibler Prozeß. Deubiquitinierende Enzyme (DUBs) spalten einzelne Ubiquitinmoleküle von ihren Substraten ab, kürzen Polyubiquitinketten und dienen der Prozessierung von Ubiquitin-Fusionsproteinen. DUBs lassen sich in zwei große Familien einteilen: Die größeren Ubiquitin-prozessierenden Proteasen (UBPs) dienen der Ubiquitinabspaltung von großen Substraten und Polyubiquitinketten, während Ubiquitin C-terminale Hydrolasen (UCHs) kleinere Peptidsubstrate bevorzugen und N-terminal fusioniertes Ubiquitin entfernen (Wilkinson 2000). Neuere Untersuchungen konnten außerdem zeigen, daß mit dem 19S Regulator des Proteasoms mindestens vier deubiquitinierende Aktivitäten assoziiert sind. Diese sind der hochkonservierten 19S *lid* Untereinheit Rpn11 (Verma *et al.* 2002; Yao and Cohen 2002), sowie den proteasomal assoziierten Proteinen Ubp6/USP14 (Borodovsky *et al.* 2001; Leggett *et al.* 2002), UCH37 (Holzl *et al.* 2000; Lam *et al.* 1997; Lam *et al.* 1997) und UBP4 zugeordnet (Papa *et al.* 1999; Swaminathan *et al.* 1999). Ihre genauen Funktionsweisen sind jedoch noch nicht hinreichend aufgeklärt (Guterman and Glickman 2004).

### 1.3 TUMOR-ASSOZIIERTE ANTIGENE

Tumorerkrankungen gehören zu den drei häufigsten Todesursachen in industrialisierten Ländern. Sie werden durch das progressive Wachstum der Nachkommen einer transformierten Zelle verursacht. Tumoren exprimieren antigen wirkende Peptide, sogenannte Tumor-assoziierte Antigene (TAA). Diese stammen aus mutierten oder überexprimierten zellulären Proteinen und werden MHC Klasse I-abhängig auf der Zelloberfläche präsentiert. Es lassen sich verschiedene Arten von TAA unterscheiden, je nachdem welche Mutation ihnen zugrunde liegt und in welchen Geweben ihre Expression stattfindet (Renkvist *et al.* 2001):

- Streng tumorspezifische Antigene entstehen durch Punktmutationen, die häufig Teil der Onkogenese sind. Punktmutationen können eine T-Zell-Antwort dadurch hervorrufen, daß sie i) die proteasomale Generierung eines Peptids verbessern oder erst ermöglichen, ii) die vorher nicht mögliche Bindung eines Peptids an ein MHC Klasse I-Molekül bewirken, oder iii) ein Peptid derart verändern, daß für die T-Zelle ein neues Epitop entsteht.
- Differenzierungsantigene werden nur in bestimmten Gewebetypen und den daraus hervorgehenden Tumoren exprimiert. Die bekanntesten Beispiele sind die von Melanozyten und Melanomzellen exprimierten Antigene wie MART-1, Gp100, Tyrosinase oder TRP2. Bei einer immuntherapeutischen Behandlung eines solchen Tumors kann es zu einer Autoimmunreaktion kommen, die im Falle des Melanoms zur Zerstörung der hauteigenen Pigmentzellen führt.
- Weit exprimierte Tumorantigene werden sowohl in normalen Geweben als auch in histologisch verschiedenen Tumoren exprimiert. Ein Beispiel ist das sowohl von gesunden Epithelzellen als auch von Melanomen, Ovarial-, Brust- und Pankreaskarzinomen exprimierte HER2/neu. Häufig kommt es im Tumor zu einer Überexpression dieser Antigene, die eine erhöhte MHC Klasse I-Präsentationsdichte der zugehörigen Peptide zur Folge hat. Während die Peptidkonzentration auf der Oberfläche normaler Zellen für die T-Zell-Erkennung nicht ausreicht, können Tumorzellen von entsprechenden T-Lymphozyten erkannt und lysiert werden.

Obwohl Tumor-assoziierte körpereigene Antigene *in vitro* und *in vivo* eine Anti-Tumor-Reaktion auslösen können, entsteht nur in Ausnahmefällen eine spontane Immunreaktion gegen einen etablierten Tumor. Aufgrund der negativen Selektion der T-Zellen im Thymus werden zumeist solche Lymphozyten eliminiert, die auf körpereigene Antigene reagieren. Selbst-reaktive CTLs, die dieser negativen Selektion im Thymus entgangen sind, weisen in der Regel nur eine geringe Affinität zum Antigen auf. Dieser Mechanismus dient dem Schutz vor Autoimmunität, führt aber gleichzeitig dazu, daß viele Tumoren der Erkennung und Beseitigung durch CTLs entkommen. Das Ziel einer Immuntherapie gegen Tumoren besteht darin, die Aktivierung und Proliferation verfügbarer CTLs zu induzieren. TAA, die in hoher

Dichte von vielen verschiedenen Tumoren, nicht aber von normalen Geweben präsentiert werden, sind besonders geeignete Kandidaten für die Herstellung einer Tumorstoffimpfung. Ein immuntherapeutischer Angriff auf die Tumorzellen sollte sich außerdem solche Antigene zunutze machen, deren Expression für das Tumorstoffwachstum unentbehrlich ist. Die funktionelle Beteiligung eines Antigens an der Onkogenese gewährleistet, daß die Tumorzelle ihr malignes Potential einbüßt, falls sie sich der Therapie durch Mutation oder verminderte Expression des relevanten Antigens (*immune escape*) entzieht (Mapara and Sykes 2004).

### 1.3.1 Das Tumorstoffantigen hTERT

Die Telomerase ist ein Ribonukleoprotein-Komplex aus einer konstitutiv exprimierten RNA-Untereinheit, der katalytischen Untereinheit hTERT (humane Telomerase Reverse Transkriptase) und assoziierten Proteinen. Sie dient der Erhaltung der Telomere an den Enden linearer Chromosomen, die während der Zellteilung an Länge verlieren. Das Erreichen einer kritischen Telomerlänge hat einen Proliferationsstillstand zur Folge und wird mit dem Alterungsprozeß einer Zelle in Zusammenhang gebracht. Während normale Zellen aufgrund reprimierter hTERT-Expression nur in Ausnahmefällen wie Keim- oder Stammzellen Telomeraseaktivität aufweisen, wird die Transkription von hTERT in über 85% aller Tumorzellen verschiedenster Gewebetypen aktiviert (Kim *et al.* 1994). Die hTERT-Expression ist mit dem unbegrenzten replikativen Potential einer Tumorzelle verbunden, und ihre Inhibition führt in humanen Tumorzellen zur Unterbrechung des Zellwachstums (Greenberg *et al.* 1999; Hahn *et al.* 1999; Herbert *et al.* 1999). Daher stellt hTERT ein geeignetes Antigen in der Tumorstoff-Immuntherapie dar.

Das Peptid hTERT<sub>540-548</sub> wurde durch die computerbasierte Vorhersage seiner Bindung an das HLA-A2.1-Molekül ermittelt (Minev *et al.* 2000; Vonderheide *et al.* 1999). Vonderheide *et al.* setzten das Peptid zur *in vitro* Stimulation humaner PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) gesunder Spender ein. Sie erhielten Lymphozytenkulturen, die zur Lyse sowohl hTERT-transfizierter als auch hTERT positiver Tumorstoffzelllinien sowie primärer Tumorstoffzellen fähig waren (Vonderheide *et al.* 1999). Minev *et al.* generierten Lymphozytenkulturen durch *in vitro* Restimulation der PBMC von Prostata-Tumor-Patienten. Sie konnten neben der Lyse Peptid-beladener T2-Zellen auch eine HLA-A2.1-restringierte spezifische Lyse verschiedenster hTERT<sup>+</sup> Tumorstoffzelllinien nachweisen (Minev *et al.* 2000). Beide Untersuchungen weisen darauf hin, daß hTERT<sub>540-548</sub> endogen prozessiert und im HLA-Kontext präsentiert wird und eine Expansion von Vorläufer-Lymphozyten aus dem peripheren adulten Repertoire ermöglicht.

### 1.3.2 Das Tumorantigen MUC1

MUC1 ist ein Mitglied der Mucin-Familie von Glykoproteinen mit hohem Molekulargewicht, welche von Epithelzellen in Drüsen und Ausführungsgängen gebildet werden. Als besonderes Charakteristikum innerhalb der Mucin-Familie weist MUC1 eine Transmembran-Domäne auf. Es gehört zur Gruppe der weit exprimierten Tumorantigene, die sowohl in normalen Geweben als auch in histologisch verschiedenartigen Tumoren vorkommen. Die physiologische Mucin-Expression ist charakteristisch für Milch- und Speicheldrüsen sowie respiratorisches, gastrointestinales und reproduktives Epithel. Dagegen findet die MUC1-Überexpression besonders auf Adenokarzinomen wie dem Brust- und Ovarial-Karzinom statt, sowie auf hämatologischen Tumoren wie dem Multiplen Myelom und dem B-Zell-Lymphom. Sie korreliert mit hohem metastatischem Potential und schlechter Prognose der Tumorerkrankung (Fung and Longenecker 1991; Kobayashi *et al.* 1992).

Die physiologische MUC1-Expression ist auf die apikale, dem Lumen zugewandte Membranseite des Epithels beschränkt. Viele der langen Oligosaccharide enden in Sialylsäureresten mit stark negativer Ladung und verleihen MUC1 den Charakter eines typischen Anti-Adhäsions-Moleküls (Hilkens *et al.* 1992; Ligtenberg *et al.* 1992; Wesseling *et al.* 1995). In einer Tumorzelle ist die MUC1-Expression nicht mehr apikal polarisiert, sondern über die gesamte Plasmamembran verteilt. Ihre Stärke nimmt in transformierten Zellen um das bis zu Zehnfache zu. Gleichzeitig ist die Aktivität der Sialyltransferase zehnfach erhöht (Graham *et al.* 1996). Diese Merkmale erleichtern dem Tumor die Metastasierung (Nakamori *et al.* 1994).

Das strukturelle Kennzeichen aller Mucine ist eine große Domäne aus tandemartig sich wiederholenden Untereinheiten (VNTR, *variable numbers of tandem repeats*). Die Anzahl dieser Tandemwiederholungen im MUC1-Gen liegt im Bereich von 20 bis 125, variiert jedoch stark zwischen verschiedenen Allelen (Gendler *et al.* 1990; Swallow *et al.* 1987). Jedes MUC1-VNTR codiert für ein Peptid aus 20 Aminosäuren (PDTRPAPGSTAPPAHGVTS<sub>A</sub>, Abb.6) (Feizi *et al.* 1984). Der unterstrichene Teil der Sequenzwiederholung stellt das HLA-A2.1-abhängige Epitop MUC1<sub>9-17</sub> dar. Durch die Immunisierung HLA-A2.1-transgener Mäuse sowohl mit dem MUC1-Protein als auch mit dem MUC1<sub>9-17</sub>-Epitop konnten ohne weitere *in vitro* Restimulation CTLs generiert werden, die MUC1<sub>9-17</sub>-beladene HLA-A2.1<sup>+</sup> Zielzellen lysierten (Apostolopoulos *et al.* 1997). Im letzten VNTR ist das Epitop durch zwei physiologische Aminosäuresubstitutionen gekennzeichnet (STAPPVHNV, Aminosäuren 950-958). Das Auftreten des sekundären Ankerrestes Valin an Position P6 könnte zu einer Verstärkung der Bindungsaffinität an das HLA-A2.1-Molekül führen. Das Peptid MUC1<sub>950-958</sub> wurde zur *in vitro* Restimulation humaner PBMCs aus gesunden Spendern eingesetzt. Die dabei gewonnenen Lymphozytenkulturen waren zur HLA-A2.1-restringierten Lyse MUC1-exprimierender

Tumorzellen fähig (Brossart *et al.* 1999). Ebenso wie das zuvor vorgestellte Tumorepitop hTERT<sub>540-548</sub> stellen die beiden MUC1-Epitope mögliche Kandidaten zur Generierung einer Tumorstoffimpfung dar.

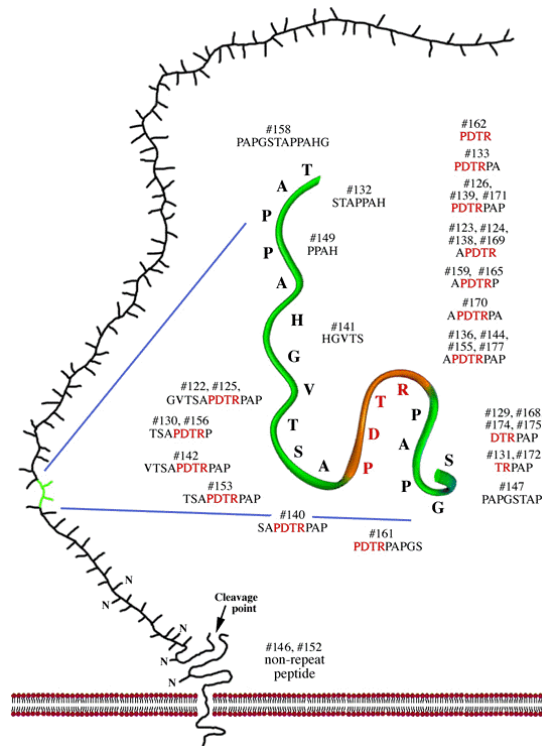


Abb. 6: Aufbau des membranständigen MUC1-Glykoproteins. Die extrazelluläre Domäne besteht aus einer variablen Anzahl hochglykosylierter Tandemwiederholungen einer Sequenz aus 20 Aminosäuren (VNTR, *variable numbers of tandem repeats*). Sie ist gefolgt von einer Transmembrandomäne und einem kurzen cytoplasmatischen C-Terminus (Abb. [www.med.uio.no/dnr/ISOBM/Slides.htm](http://www.med.uio.no/dnr/ISOBM/Slides.htm)).

#### 1.4 TUMORIMMUNISIERUNG MIT PLASMID-DNA

An der Entwicklung von Tumorstoffimpfungen arbeiten verschiedene Gruppen mit variierenden Ansätzen, z.B. unter Verwendung von genetisch modifizierten Tumorzellen, TAA-beladenen oder -transfizierten dendritischen Zellen, von löslichen Proteinen oder synthetischen Peptiden sowie von rekombinanten Viren, die für TAA codieren (Bocchia *et al.* 2000). Die Technik der Immunisierung mit Plasmid-DNA wurde 1990 von Wolff *et al.* entwickelt, die beobachteten, daß Muskelzellen der Maus nach intramuskulärer DNA-Injektion fremde Antigene exprimieren (Wolff *et al.* 1990). Da die Plasmide episomal in der Wirtszelle persistieren, führen sie zu einer stabilen Langzeitexpression des codierten Antigens (Wolff *et al.* 1992) und tragen zur permanenten Stimulation des Immunsystems bei. Der erste Nachweis einer protektiven Immunantwort durch DNA-Vakzine gelang anhand des Influenza A Nucleoproteins (Ulmer *et al.* 1993).

Es konnte gezeigt werden, daß professionelle APCs mit Herkunft aus dem Knochenmark für die Stimulierung naiver CTLs nach intramuskulärer Plasmid-Immunisierung verantwortlich sind (Corr *et al.* 1996; Fu *et al.* 1997; Iwasaki *et al.* 1997). Die APCs erwerben das Antigen entweder durch direkte Transfektion (Casares *et al.* 1997; Condon *et al.* 1996; Iwasaki *et al.* 1999) oder durch die Übernahme von transfizierten nicht-lymphoiden Zellen (Corr *et al.* 1999; Doe *et al.* 1996). Obwohl die Interaktion zwischen APC und CTL hauptsächlich auf endogen exprimierten Proteinen basiert, gibt es alternative Wege für das Erwerben und Beladen exogener Proteine (Harding and Song 1994; Kovacsovics-Bankowski and Rock 1994; Kovacsovics-Bankowski and Rock 1995; Srivastava 1994). Die Stimulierung naiver CTLs durch professionelle APCs, die Peptide von „Donor“-Zellen erworben haben, wurde erstmals 1976 von Bevan beschrieben und als *cross priming* bezeichnet (Bevan 1976). In einer neuen Untersuchung konnte gezeigt werden, daß dieser Prozeß auf dem Transfer proteasomaler Substrate beruht (Norbury *et al.* 2004).

Plasmid-Vakzine umgehen im Unterschied zu viralen Vektoren das Problem der DNA-Rekombination und lösen auch bei wiederholter Anwendung keine unerwünschten systemischen Immunreaktionen aus. Durch die Einführung immunstimulatorischer sogenannter CpG-Sequenzen (Davis 2000) und die Nutzung starker Promotoren können DNA-Vakzine in ihrer Effizienz gesteigert werden. Während Plasmid-Vakzine gegen infektiöse Erkrankungen in Tiermodellen bereits Erfolge erzielt haben (Leitner *et al.* 1999), ist ihre Anwendung in der Tumorthherapie jedoch durch das Problem der schwachen Immunogenität begrenzt. Daher muß die Entwicklung von Plasmiden zur Tumorummunisierung hinsichtlich effizienter Epitopgenerierung optimiert werden.

Die Identifizierung des Epitops als kleinste immunogene Einheit eines antigenen Proteins führte zur Generierung Epitop-basierter Vakzine. Diese umgehen mögliche Gefahren bei der Anwendung von Genen bzw. Proteinen mit transformierenden Eigenschaften. Plasmid-codierte Epitope können trotz unphysiologischer flankierender Aminosäuresequenzen prozessiert und MHC Klasse I-abhängig präsentiert werden (Thomson *et al.* 1996; Thomson *et al.* 1998). Diese Beobachtung führte zur Entwicklung von Polyepitop-Vakzinen (Oldstone *et al.* 1993; Whitton *et al.* 1993), die multiple CTL-Antworten auslösen können. Verschiedene Untersuchungen zur Plasmid-Immunisierung nutzen außerdem die Generierung von Fusionsprodukten aus Ubiquitin und einem Antigen, um das Antigensubstrat schneller zum proteasomalen Abbauweg zu befördern und seine Epitope der MHC-abhängigen Präsentation zugänglich zu machen (Delogu *et al.* 2000; Tellam *et al.* 2001).

## 1.5 DAS TRANSGENE MAUSMODELL HHD

Seit der Etablierung des Gentransfers zwischen Säugetieren und der Charakterisierung der ersten humanen MHC Klasse I-Gene (HLA) haben HLA-transgene Mäuse Einzug in viele Labore gefunden (Arnold and Hammerling 1991). Sie stellen ein geeignetes Tiermodell zur Untersuchung HLA-restringierter CTL-Antworten und zur Entwicklung anti-viraler und anti-tumoraler Vakzine dar. Klassische transgene Mäuse, die noch ihre eigenen MHC Klasse I-Moleküle (H2) exprimieren, neigen jedoch zur Ausbildung H2-abhängiger CTL-Antworten (Barra *et al.* 1989; Engelhard *et al.* 1991). Die Substitution der  $\alpha 3$ -Domäne des humanen HLA-Moleküls durch die homologe H2-Domäne der Maus verbessert entscheidend die Erkennung und "Nutzung" der transgenen HLA-Moleküle durch den murinen T-Zell-Rezeptor (Kalinke *et al.* 1990; Vitiello *et al.* 1991). Die zusätzliche Deletion des murinen MHC Klasse I-Locus zwingt das murine CTL-Repertoire sowohl auf Thymus-Ebene als auch peripher zur Kooperation mit dem humanen HLA-Molekül. Sie sorgt damit für eine weitere Verbesserung der Interaktion zwischen HLA-spezifischen CTLs und Antigen-präsentierender Zelle (Pascolo *et al.* 1997; Ureta-Vidal *et al.* 1999).

Das in dieser Arbeit zur Gewinnung von CTLs und zur Plasmid-Immunisierung verwendete transgene Mausmodell zeichnet sich durch ebendiese Eigenschaften aus und wird als "HHD" (human-human-D<sup>b</sup>) bezeichnet (Firat *et al.* 1999). Die MHC Klasse I-Untereinheiten  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$ , die der Epitopbindung dienen, sind humanen Ursprungs (HLA-A2.1). Die Untereinheit  $\alpha 3$ , die als Bindungsdomäne für den Corezeptor CD8 fungiert, stammt aus der Maus (H2-D<sup>b</sup>). Das murine  $\beta_2$ -Mikroglobulin ist durch sein humanes Homolog ersetzt, welches kovalent mit dem chimären MHC Klasse I-Molekül assoziiert ist (Abb.7). Im Vergleich zu klassischen HLA-transgenen Mäusen exprimieren HHD-Mäuse weniger HLA-A2.1-Moleküle auf der Zelloberfläche und bilden eine geringere Gesamtzahl an CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus. Eine detaillierte Analyse der T-Zell-Rezeptoren von CD8<sup>+</sup> Lymphozyten ergab jedoch, daß HHD-Mäuse ein qualitativ normal variables CD8<sup>+</sup> T-Zell-Repertoire besitzen. Sie mobilisieren außerdem als Antwort auf HLA-A2.1-restringierte Antigene eine größere Vielzahl an CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten als klassische transgene Mäuse (Firat *et al.* 2002). Es handelt sich daher bei den HHD-Mäusen zur Zeit um das geeignetste Tiermodell zur Untersuchung HLA-A2.1-abhängiger CTL-Antworten.

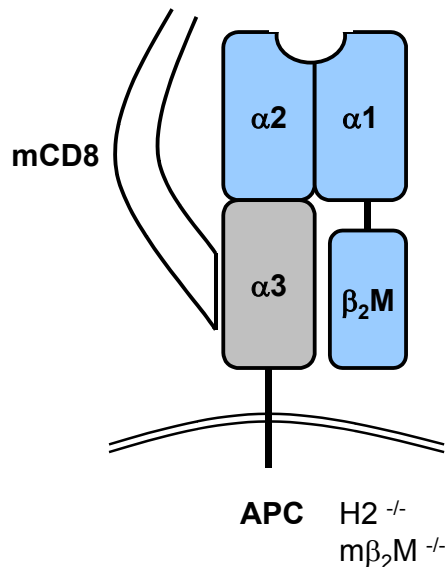


Abb. 7: Aufbau des HHD-Moleküls. Die Domänen  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  stammen vom humanen MHC Klasse I-Molekül HLA-A2.1 und sind kovalent mit dem humanen  $\beta 2$ -Mikroglobulin assoziiert. Die  $\alpha 3$ -Domäne stammt aus dem murinen MHC Klasse I-Molekül  $H2-D^b$ . APC: Antigen-präsentierende Zelle; m: murin;  $\beta_2M$ :  $\beta 2$ -Mikroglobulin.

## 1.6 ZIELSETZUNG

Das zunehmende Verständnis der regulierenden Funktionen des Immunsystems bei der Tumorabwehr und die Identifizierung von Tumorantigenen haben neue Möglichkeiten zur Entwicklung von Tumorstoffen eröffnet. Eine Vakzinierung dient der Aktivierung spezifischer cytotoxischer T-Zellen und dem Durchbrechen der tumoralen Immuntoleranz. Das Ubiquitin / Proteasomensystem trägt maßgeblich zur Generierung antigener Tumorpeptide bei, die MHC Klasse I-gebunden auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Diese Antigenpräsentation dient der Erkennung der transformierten Zelle und ihrer Zerstörung durch CTLs. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine Polyepitop-Vakzine gegen humane Tumoren entwickelt und geprüft werden. Als Modell-Tumorantigene wurden hTERT und MUC1 gewählt, die bekannte Epitope mit HLA-A2.1-Restriktion beherbergen. Die Vakzine in Form von Plasmid-DNA sollte diese Epitope in optimierter Sequenzfolge und in Fusion mit Ubiquitin codieren. Für die Gewinnung cytotoxischer T-Zellen durch Immunisierung wurde das transgene Mausmodell HHD verwendet, welches sich durch ein chimäres HLA-A2.1-Molekül bei gleichzeitiger Deletion des murinen MHC Klasse I-Locus auszeichnet. Folgende Fragen sollten geklärt werden (Abb.8):

1. Welche Sequenzfolge eines Polyepitops führt zur optimalen Generierung der gewünschten Einzelpeptide durch das 20S Proteasom *in vitro*?
2. Trägt die Fusion des Polyepitops mit Ubiquitin zu einer verbesserten 26S proteasomalen Degradation *in vivo* bei?



3. Führt der effiziente Abbau eines (ubiquitinierten) Polyepitops *in vivo* zu einer ausreichenden Präsentation der Epitope auf der Zelloberfläche?
4. Werden durch Immunisierung von Mäusen mit der Plasmid-Vakzine spezifische cytotoxische T-Zellen in detektierbaren Mengen aktiviert?

Die vorliegende Arbeit soll einen umfassenden methodischen Ansatz zur Entwicklung von Polyepitop-Vakzinen auf dem Gebiet der Tumorimmunologie liefern. Sie berücksichtigt die intrazellulären Vorgänge der Antigenprozessierung und -präsentation und bedient sich der geeigneten Tumor- und Tiermodelle, um die Abläufe im humanen System zu reflektieren.

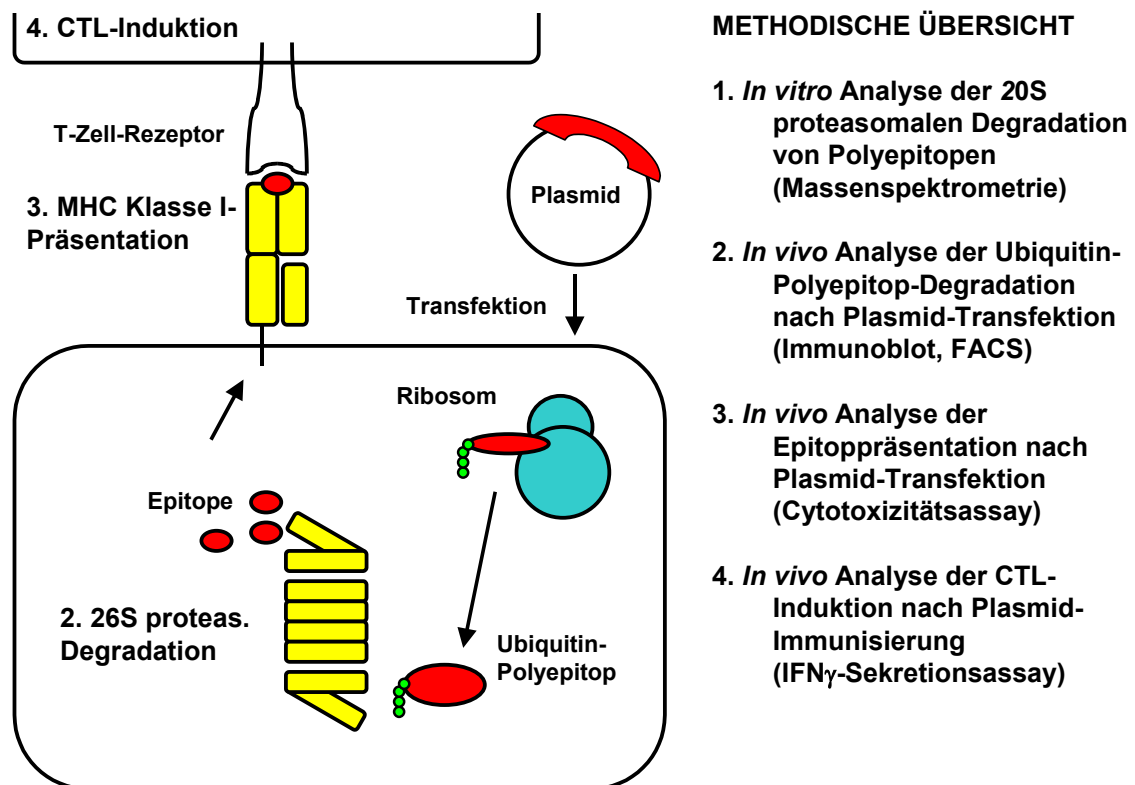


Abb. 8: Überblick zu den Versuchsanordnungen der vorliegenden Arbeit.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 Geräte

Agarosegelkammer Geltray	Renner
Chromatographiesäule 2,5 x 20 cm	Biorad
Dounce-Homogenisator	Kontes Glass
Easyject Optima Elektroporator	EquiBio
Elektrophorese-Einheit Mighty Small II SE250/SE260	Hoefer
FACSCalibur	Becton Dickinson
Fluorimeter Fluostar Reader mit Easy Software	SLT
FPLC Äkta	Amersham
Gamma-Bestrahlungsgerät	STS GmbH
Gamma-Counter, Einkanalmeßgerät Cobra	Canberra-Packard
GS-158 Zentrifuge	Beckmann
HPLC System Gold, Detektor 166	Beckman
HPLC-Säule: Micra NPS ODS-I 1,5 ktm PC (33x4,6mm)	Bischoff Chromatography
Kühlzentrifuge 54178	Eppendorf
Kühlzentrifuge Avanti J-25	Beckman
Kühlzentrifuge J2-HS	Beckman
Kühlzentrifuge RC24	Sorvall
Massenspektrometer TSQ 7000	Finnigan Mat
Medifuge	Heraeus
Mikroskop Leitz DMRD	Leica
Minigel-System	Biorad
MonoQ-Säule HR5/5	Pharmacia
PCR Maschine UNO Thermoblock	Biometria
Photometer UV-2102 PC Software UV-X101 PC	Shimadzu
Rotor GA/18	Beckman
Rotor SS34	Sorvall
Rotor SW40	Beckman
Semidry-Blotkammer	pQLAB
Steril gard Hood classII A1 B3	Baker
Ultrafiltrationszelle 50 ml	Amicon
Ultrazentrifuge Ultra Pro 80	Sorvall
Zellkultur-Inkubator BB4220CV	Heraeus

#### 2.1.2 Chemikalien, Lösungen, Verbrauchsmaterialien

3MM Papier	Whatman
Acrylamidlösung 30%, 29:1	Roth
Acryl-Küvetten	Sarstedt
Agarose	Serva
Amidoschwarz	Merck
6-Amino-Hexansäure	Roth
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Merck
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Ampholine, Isodalt 3-10	Serva
Ampholine, Isodalt 5-7	Serva
Ampicillin	AppliChem
Aprotinin	AppliChem
Bacto-Agar	AppliChem
Bacto-Trypton	AppliChem
β-Mercaptoethanol	Serva

$\beta_2$ -Mikroglobulin, human	ICN Biochemicals
Brefeldin A	Serva
Bromphenolblau	AppliChem
BSA (Bovines Serum-Albumin), Fraktion V	Serva
Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )	Sigma
Chloropholred-D-Galactopyranoside	Calbiochem
Chromium Nuclid $^{51}\text{Cr}$	NEN
Coumarinsäure	Sigma
DAPI (4',6-diamidino-2-Phenylindol)	Merck
DEAE Sephacel	Pharmacia
Deckgläser	Menzel-Gläser
Dextransulfat	Pharmacia
Diaflo Membran XM 300	Amicon
Diazobicyclo (2.2.2) Oktan	Fluka
Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	AppliChem
DMEM	Biochrom
DMF (Dimethylformamid)	Sigma
DMSO	Fluka
dNTP	Invitrogen
DTT	AppliChem
EDTA	AppliChem
Elektroporations-Küvetten 4 mm	EquiBio
Epoxomycin	Calbiochem
Essigsäure	Merck
Ethanol	Baker
Ethidiumbromid	AppliChem
Filtereinheit FP 30/0,2 CA-S	Schleicher & Schuell
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom
fluorogene Peptid-Substrate	Bachem
G418-Sulfat	Sigma
Gelatine	Roth
Glycerin	Roth
Glycin	BioRad
Hefe-Extrakt	DIFCO
HEPES	Roth
HPLC-Acetonitril	Baker
HPLC-Wasser	Baker
Hygromycin B	Roche
Incomplete Freund's Adjuvant (IFA)	Sigma
Interferon- $\gamma$ rekombinant, murin	Roche
Interleukin-2 rekombinant, murin	Roche
Isopropanol	Baker
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem
Kaliumhydrogencarbonat ( $\text{KHCO}_3$ )	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	AppliChem
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck
Kanamycin	Serva
Kryoröhrchen	Nunc
Lactacystin	Calbiochem
Leupeptin	Applchem
L-Glutamin	Biochrom
Lipopolysaccharid (Salmonella Typhosis)	Sigma
Luminol	Fluka
Magnesiumacetat	Merck
Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4$ )	Sigma

Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	AppliChem
Manganchlorid (MnCl <sub>2</sub> )	Fluka
Methanol	Baker
Mikrotiterplatten, schwarz	Dynatec
Milchpulver	AppliChem
Molekulargewichtsstandard, DNA	GibcoBRL
Molekulargewichtsstandard, Protein prestained	Amersham
MOPS	AppliChem
Mowiol 40-88	Sigma
Natriumacid (NaN <sub>3</sub> )	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem
Natriumhydroxid (NaOH)	AppliChem
Nitrocellulose, BA-S85, verstärkt	Schleicher und Schuell
Nylon-Zellsieb 70 µm	Falcon
Objektträger	Menzel-Gläser
Paraformaldehyd	Merck
Penicillin / Streptomycin	Seromed
Pepstatin A	Sigma
Pferdeserum	Biochrom
Phenolrot	Serva
PMSF	Sigma
Propidiumiodid	Sigma
Proteinsepharose A	Sigma
Puromycin	Fluka
Röntgenfilme Xomat-UV/AR/Biomax-MR	Kodak
RPMI	Biochrom
Rubidiumchlorid (RbCl)	Sigma
Saponin	Fluka
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	AppliChem
Serva Blue R250	Serva
Sterilfilter 4.5, 0,2 µm	Schleicher und Schuell
TEMED	Roth
Tetracyclin	Sigma
Tetramere	ProImmune
Transfektions-Reagens FuGene 6	Roche
Trifluoessigsäure (TFA)	Fluka
Tris	AppliChem
Triton X-100	Sigma
Trypanblau-Lösung	Sigma
Trypsin-EDTA	GibcoBRL
Tween 20	Serva
Wasserstoffperoxid	Roth
Xylencyanol	Serva
Zellkultur-Plastikwaren, steril	Falcon, Greiner

### 2.1.3 Kits

EndoFree Plasmid Giga Kit	QIAGEN
Mouse IFN-γ Secretion Assay Detection Kit	Miltenyi Biotec
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
TOPO TA Cloning TM Kit	Invitrogen

### 2.1.4 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma BioTeZ Berlin-Buch GmbH geliefert.

Muc for Oligo	5'- TCT ACT GCT CCT CCA GTT CAT AAT GTC TCC ACC GCC CCG CCC GTC CAT AAC GTA TCG ACG GCG CCG CCG GTG CAC AAT GTT TCA ACA GCA CCA CCT GTA CAC AAT GTG A -3'
Muc rev Oligo	5'- CAC ATT GTG TAC AGG TGG TGC TGT TGA AAC ATT GTG CAC CGG CGG CGC CGT CGA TAC GTT ATG GAC GGG CGG GGC GGT GGA GAC ATT ATG AAC TGG AGG AGC AGT AGA A -3'
Muc for 1,2,3	5'- AAT GGA TCC TCT ACT GCT CCT CCA GTT -3'
Muc for 4	5'- CGG AAT TCA TGT CTA CTG CTC CTC CAG TT -3'
Muc rev 1,2,3	5'- AAG TCT AGA CTA CAC ATT GTG TAC AGG TGG -3'
Muc rev 4	5'- CGG GAT CCC ACA TTG TGT ACA GGT GG -3'
Ub hin	5'- ATG CAG ATC TTC GTG AAG ACT -3'
Ub rück	5'- TTA CCC ACC TCT GAG ACG GAG -3'
Ub for 1,2,3	5'- GCC GAA TTC ATG CAG ATC TTC GTG AAG ACC -3'
Ub for 4	5'- CGG GAT CCA TGC AGA TCT TCG TGA AGA CC -3'
Ub rev 1	5'- ATT GGA TCC CCC ACC TCT GAG ACG GAG CAC -3'
Ub rev 2	5'- ATT GGA TCC TGC ACC TCT GAG ACG GAG CAC -3'
Ub rev 3	5'- ATT GGA TCC TCT CCC ACC TCT GAG ACG GAG -3'
Ub rev 4	5'- GCT CTA GAT TAC CCA CCT CTG AGA CGG AG -3'
NheI-Ubi1,2,3-hin	5'- CTA GCT AGC ATG CAG ATC TTC GTG AAG -3'
Muc1,2,3-HindIII-rück	5'- CCC AAG CTT CTA CAC ATT GTG TAC AGG -3'
EGFP-BamHI-for	5'- CGC GGA TCC ATG GTG AGC AAG GGC -3'
EGFP-BamHI-rev	5'- CGC GGA TCC CTT GTA CAG CTC GTC -3'
Eco-Muc-TOPO	5'- GAA TTC ATCCAC CGC CCC TCC AGT CCA CAA TGT CCT CGA GA -3'
Muc-Xho-TOPO	5'- CTC GAG GAC ATT GTG GAC TGG AGG GGC GGT GGA TGA ATT CA -3'

### 2.1.5 Plasmide

pCI	Promega (Johnen 2002)
pCMV-B10	Invitrogen (pcDNA3, Firat 1999)

### 2.1.6 Antikörper

Maus $\alpha$ HLA-ABC-FITC (1:100 FACS)	OneLambda
Maus $\alpha$ HLA-A2 (1:50 FACS)	OneLambda
Maus $\alpha$ CD8 (1:100 FACS)	Immunotech
Maus IgG Isotypenkontrolle-FITC (1:100 FACS)	Immunotech
Maus $\alpha$ GFP (1:10000 Immunoblot)	Babco
Maus $\alpha$ MUC1 <sub>950-958</sub> „14G2“ (1:10 Immunoblot)	Dr. A. Zvirbliene
Ziege $\alpha$ Maus IgG-FITC (1:100 FACS)	Dianova
Kaninchen $\alpha$ Maus IgG-Peroxidase (1:5000 Immunoblot)	Dianova

### 2.1.7 Enzyme

High Fidelity DNA Polymerase	Roche
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Roche
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs

### 2.1.8 Peptide

Die Synthese der Peptide wurde von der Peptidsynthese-Gruppe des Instituts für Biochemie der Charité durchgeführt und erfolgte über Festphasen-Synthese durch einen Applied Biosystems 433A automatisierten Synthesizer (Norwalk, CT). Der Reinigung mittels HPLC folgte eine Massenanalyse über MALDI-TOF (Reinheit >90%). Die Peptide wurden in Aqua bidest. / 5-10% DMSO zu einer Endkonzentration von 1 mM gelöst.

Pep 105	MLRMDSTAPPVHNVSTAPPVHNVSTAPPVHNV	
Pep 161	ILAKFLHWLILAKFLHWLILAKFLHWLILAKFLHWL	
Pep 165	AEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVEL	
Pep 166	MLMYILAKFLHWLGGYILAKFLHWLGGYILAKFLHWL	
Pep 169	ILAKFLHWL-COOH	hTERT <sub>540-548</sub>
Pep 170	RLMYDILAKFLHWLGPSEKRVWMS	
Pep 171	AHGVILAKFLHWLSTAPPAHGVILAKFLHWLSTAPPA	
Pep 173	QMNLILAKFLHWL CMTWNQMNLILAKFLHWL CMTW	
Pep 174	STAPPAHGV-COOH	MUC1 <sub>9-17</sub>
Pep 175	CMTWNQMNL-COOH	WT1 <sub>235-243</sub>
Pep 181	RLMYILAKFLHWLGPSRLMYILAKFLHWLGPS	
Pep 186	MLMYSTAPPAHGVSTAPPAHGVSTAPPAHGV	
Pep 194	VHNVILAKFLHWLSTAPPVHNVILAKFLHWLSTAPPV	
Pep 241	STAPPVHNV-COOH	MUC1 <sub>950-958</sub>
Pep 275	YTAPPVHNV-COOH	MUC1 <sub>950-958</sub> -P1Y
Pep 276	TPPAYRPPNAPIL-COOH	HBVcore <sub>128-140</sub>
Pep 18	GILGFVFTL-COOH	Influenza Matrix Protein <sub>58-66</sub>
Pep 322	ILKEPVHGV-COOH	HIV1 Pol <sub>464-472</sub>

## 2.2 METHODEN

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Amplifikation von DNA durch PCR

Der PCR-Ansatz erfolgte auf Eis in 0,5 ml Eppendorf-Tubes mit den in Tab.1-3 angegebenen Konzentrationen, Primern, Temperatur- und Zeitparametern.

Tab. 1: Konzentrationen der PCR-Komponenten.

	Konzentration
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl
10x Puffer	1x (incl. 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
dNTP	je 200 µM
Primer	je 0,5 µM
DNA Polymerase	1,5 U High Fidelity
DNA	500 ng HeLa gen. DNA / 30 ng Plasmid-DNA

Tab. 2: Temperatur- und Zeitparameter der PCR-Bedingungen.

	Temperatur (°C)	Zeit (min)
Initiale Denaturierung	94	5
Denaturierung	94	1
Annealing	s.u.	s.u.
Elongation	72	s.u.
Finale Elongation	72	10
Zyklen	30	

Tab. 3: Primerkombinationen mit ihren Annealing- und Elongationsparametern.

PCR-Konstrukt	Forward Primer	Reverse Primer	Annealing (°C / Sek.)	Elongation (Sek.)	DNA <i>template</i>
Muc 1	Muc for 1,2,3	Muc rev 1,2,3	56 / 30	20	TOPO-MUC
Muc 2	Muc for 1,2,3	Muc rev 1,2,3	56 / 30	20	TOPO-MUC
Muc 3	Muc for 1,2,3	Muc rev 1,2,3	56 / 30	20	TOPO-MUC
Muc 4	Muc for 4	Muc rev 4	56 / 30	20	TOPO-MUC
Ubiquitin	Ub hin	Ub rück	50 / 30	30	HeLa gen. DNA
Ub 1	Ub for 1,2,3	Ub rev 1	63 / 60	45	TOPO-Ub
Ub 2	Ub for 1,2,3	Ub rev 2	63 / 60	45	TOPO-Ub
Ub 3	Ub for 1,2,3	Ub rev 3	63 / 60	45	TOPO-Ub
Ub 4	Ub for 4	Ub rev 4	60 / 60	45	TOPO-Ub
Muc1-Ubi1	NheI-Ubi1,2,3-hin	Muc1,2,3-HindIII-rück	58 / 60	45	pCI-1
Muc2-Ubi2	NheI-Ubi1,2,3-hin	Muc1,2,3-HindIII-rück	58 / 60	45	pCI-2
EGFP-BamHI	EGFP-BamHI-for	EGFP-BamHI-rev	56 / 60	50	pEGFP-N3

#### 2.2.1.2 DNA-Agarosegelelektrophorese

50x Puffer TAE: 242 g Trisbase, 57 ml Essigsäure, 100 ml EDTA (0,5M pH 8), Bidest ad 1 l  
 Laufpuffer und Puffer zum Lösen der Agarose: 50x TAE 1:50 verdünnt in Aqua dest.,  
 Ethidiumbromid im Agarosegel 1 µg/ml

10x DNA-Probenpuffer: 50% Glycerin, 10 mM EDTA, 0,2% Bromphenolblau, 0,2% Xylencyanol  
 DNA-Fragmente wurden mit dem 10x DNA-Probenpuffer versetzt und elektrophoretisch im 1-2%  
 Agarosegel im Laufpuffer bei 80-120 V aufgetrennt (Maniatis *et al.* 1989).

### 2.2.1.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel

Für die Isolation von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel wurde der QIAquick Gel Extraction Kit verwendet.

### 2.2.1.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte durch Messung der Absorption bei 260 nm (Maniatis *et al.* 1989). 50 mg/ml Doppelstrang-DNA entsprechen  $A_{260} = 1$ .

### 2.2.1.5 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

Der Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Eine Einheit Enzym verdaut bei optimalen Puffer- und Temperaturbedingungen 1 µg DNA in einer Stunde.

### 2.2.1.6 Dephosphorylierung von DNA

Bei allen Klonierungen wurde zur Vermeidung der Religation des Plasmids die Plasmid-DNA nach Restriktionsverdau und Agarosegel-Aufreinigung an den 5'-Enden dephosphoryliert. Hierzu wurden 50 µl der aufgereinigten DNA mit einer Einheit Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) in entsprechendem Puffer versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C erfolgte eine Hitzeinaktivierung des Enzyms für 20min bei 65°C.

### 2.2.1.7 Herstellung doppelsträngiger DNA aus Oligonukleotiden

Annealing-Puffer: 10 mM Tris, 100 mM NaCl

Je 1 µl der Oligonukleotide (10 µg/µl) wurden mit 18 µl Annealing-Puffer versetzt, 5min bei 95°C im Heizblock erhitzt und anschließend in einem 65°C Wasserbad auf RT abkühlen gelassen. Von diesem Ansatz wurden 2 µl in die TOPO-Klonierung eingesetzt.

### 2.2.1.8 Ligation von Insert-DNA in Plasmid-DNA

50 ng Plasmid-DNA wurden mit der zehnfachen molaren Menge Insert-DNA in einem Volumen von 20 µl mit 200 U T4-DNA-Ligase ü.N. bei 16°C inkubiert.

### 2.2.1.9 Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen

φa-Medium: 0,5% Hefeextrakt, 2% Bactotrypton, 40 mM MgSO<sub>4</sub> • 7 H<sub>2</sub>O, Bidest ad 1 l; Einstellung des pH-Werts mit KOH auf pH 7,6 und autoklavieren

Puffer Tfb I: 30 mM KOAc, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub> • 2 H<sub>2</sub>O, 50 mM MnCl<sub>2</sub> • 4 H<sub>2</sub>O, 15% Glycerin, Bidest ad 100 ml; Einstellung des pH-Werts mit 0,2M Essigsäure auf pH 5,8 und Sterilfiltration, Lagerung bei 4°C

Puffer Tfb II: 10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub> • 2 H<sub>2</sub>O, 15% Glycerin, Bidest ad 100 ml; Einstellung des pH-Werts mit KOH auf pH 5,8 und Sterilfiltration, Lagerung bei 4°C

Aus einem DH5α-Glycerinstock wurden 5 µl Bakterien auf eine LB-Platte ausgestrichen und ü.N. bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 5 ml φa-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und ü.N. bei 37°C geschüttelt. 100 ml φa-Medium wurden auf 37°C vorgewärmt und mit 2 ml der Übernachtskultur angeimpft. Die Kultur wurde bis zu einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,5 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Dann wurde die Kultur 5min auf Eis gekühlt und anschließend 5min bei 6000 rpm und 4°C in der Sorvall-Zentrifuge (Rotor SS-34) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 40 ml eiskaltem Tfb I resuspendiert, 15min auf Eis inkubiert und anschließend wie oben zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 4 ml eiskaltem Tfb II resuspendiert und 15min auf Eis inkubiert. Die Zellen



wurden in vorgekühlte Eppendorf-Tubes à 50 µl aliquotiert, auf Trockeneis schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### 2.2.1.10 Transformation von *E.coli* mit Plasmid-DNA

LB-Medium: 10 g Bactotrypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, Bidest ad 1 l, autoklavieren

LB-Agar: 10 g Bactotrypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 15 g Agar, Bidest ad 1 l, autoklavieren

SOC-Medium: 2% Bactotrypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glucose, autoklavieren, aliquotieren, bei -20°C lagern

Ampicillin: Stammlösung 100 mg/ml in 50% Ethanol, Endkonzentration in LB 100 µg/ml

Kanamycin: Stammlösung: 10 mg/ml, Endkonzentration in LB 50 µg/ml

50 µl kompetente *E.coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, und 10 µl Ligations-Ansatz oder 2 ng Plasmid-DNA wurde zugegeben. Nach 30min Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 45 sec im Wasserbad bei 42°C. Nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium (RT) wurden die Zellen 1h bei 37°C geschüttelt. Dann wurden die Zellen bei 3000 g für 5min pelletiert und in einem Volumen von 100 µl auf einer LB-Amp/Kan-Agarplatte ausplattiert. Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C ü.N.

#### 2.2.1.11 TOPO-Klonierung

4 µl unaufgereinigtes PCR-Produkt bzw. 2 µl doppelsträngige DNA aus Oligonukleotiden wurden mit 0,5 µl TOPO-Vektor versetzt und 5min bei RT inkubiert. Die gesamte Reaktion wurde zu einem Aliquot One Shot Chemically Competent *E.coli* gegeben und für 30min auf Eis inkubiert. Die folgende chemische Transformation wurde entsprechend der Anweisung des Herstellers für das TOPO TA Cloning TM Kit durchgeführt.

#### 2.2.1.12 Plasmid-Isolation aus *E.coli*

„Mini-Präp“

Zur Analyse der Klone aus einer Transformation wurden von der LB-Amp/Kan-Agarplatte Einzelkolonien gepickt und ü.N. in 5 ml LB-Amp/Kan-Medium bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Plasmid-Isolation erfolgte unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kits. Die Plasmid-DNA aus 1,5 ml Kultur wurde in 50 µl Aqua dest. aufgenommen. 5 µl wurden für die Analyse im Restriktionsverdau eingesetzt, 25 µl wurden zur Sequenzierung verwendet.

„Maxi-Präp“

Für die Amplifizierung von Plasmid-DNA wurde eine Einzelkolonie von der LB-Amp/Kan-Agarplatte gepickt und ü.N. in 5 ml LB-Amp/Kan-Medium bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 200 ml LB-Amp/Kan-Medium wurden mit 200 µl der Übernachtskultur angeimpft und ü.N. bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Isolation der DNA erfolgte mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit.

„Giga Präp“

Für die Amplifizierung von Plasmid-DNA zur Endotoxin-freien Immunisierung von Mäusen wurde eine Einzelkolonie von der LB-Amp/Kan-Agarplatte gepickt und ü.N. in 5 ml LB-Amp/Kan-Medium bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 2500 ml LB-Amp/Kan-Medium wurden mit 3 ml der Übernachtskultur angeimpft und ü.N. bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Isolation der DNA erfolgte mit dem EndoFree Plasmid Giga Kit.

#### 2.2.1.13 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA-Konstrukte wurde von Agowa GmbH Berlin durchgeführt.

## 2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.2.1 Zellyse

Lysepuffer: 50 mM Tris / HCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> • 6 H<sub>2</sub>O, 1 mM EDTA, 0,5% Triton, pH 7,5, Zugabe von Proteaseinhibitoren:

<u>Inhibitor</u>	<u>Stocklösung</u>	<u>Endkonzentration im Lysepuffer</u>
PMSF	10 mg / 288 µl DMSO	1 mM
Aprotinin	6,67 mg / 1 ml H <sub>2</sub> O	6,6 µM
Pepstatin A	1 mg / 1 ml Methanol	7 µM
Leupeptin	5 mg / 1 ml H <sub>2</sub> O	10 µM

Die Zellen einer 10 cm Zellkulturplatte wurden in 100 µl Lysepuffer mit frisch zugesetzten Proteaseinhibitoren aufgenommen. Bei der anschließenden Lyse durch Temperatur-Schock wurden die Zellen 3x hintereinander in flüssigen Stickstoff gegeben, dann in ein 37°C Wasserbad und dann gevortext. Nach Zentrifugation (20min 14000 rpm 4°C) wurde der Überstand (das Lysat) abgenommen (Lagerung bei -20°C).

### 2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Absorptionsmessung bei 280 nm. 1 µg/µl Protein entsprechen  $A_{280} = 1$ .

### 2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

10x Probenpuffer: 5 ml Glycerin, 1 g SDS, 5 ml Tris-HCl 1 M pH 6,8, 0,25 ml Bromphenolblau, 1 ml β-Mercaptoethanol

Acrylamidlösung: 30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid, w/v

4x Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4% SDS w/v

4x Trenngelpuffer: 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,4% SDS w/v

1x Laufpuffer: 0,3% Tris-HCl, 1,4% Glycin, 0,1% SDS

Trenngel (12%): 8 ml 30% Acrylamidlösung, 5 ml 4x Trenngelpuffer, 7 ml H<sub>2</sub>O, 60 µl 10% APS, 60 µl TEMED

Sammelgel (4,5%): 1,5 ml 30% Acrylamidlösung, 2,5 ml 4x Sammelgelpuffer, 6 ml H<sub>2</sub>O, 60 µl 10% APS, 60 µl TEMED

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte wie bei Lämmli 1970 beschrieben. Die Proben (2 µg reines Protein oder 100 µg Zellysat) wurden in 10x Probenpuffer aufgenommen, 5min bei 95°C erhitzt und abzentrifugiert. Die Trennung erfolgte bei maximal 120 V.

### 2.2.2.4 Coomassiefärbung von SDS-Minigelen

Färbelösung: 10% Methanol, 40% Essigsäure, 0,25% w/v Serva blue R250 (Farbstoff ü.N. in Methanol lösen und anschließend filtrieren)

Entfärbelösung: 40% Methanol, 10% Essigsäure

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden die SDS-Polyacrylamidgele für 30min gefärbt und anschließend für ca. 1h entfärbt. Das Trocknen erfolgte 90min bei 70°C auf Whatman-Papier.

### 2.2.2.5 Elektrotransfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulose

Western Blot semi-dry diskontinuierlich

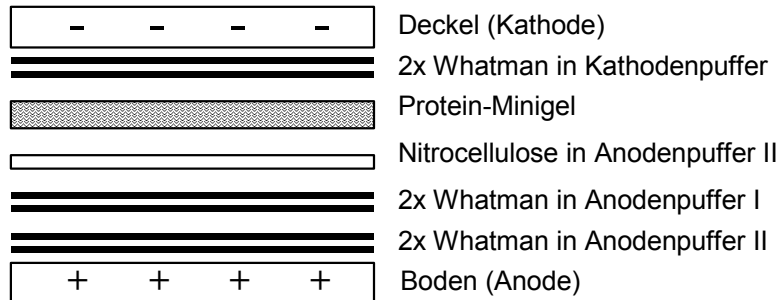
Anodenpuffer I: 0,3 M Tris, 20% Methanol

Anodenpuffer II: 25 mM Tris, 20% Methanol

Kathodenpuffer: 40 mM 6-Amino-Hexan-Säure, 20% Methanol, 0,01% SDS

5x Amidoschwarz-Lösung: 0,1% Amidoschwarz, 45% Methanol, 10% Essigsäure, für Gebrauchslösung 1:5 verdünnt in Wasser

Transferaufbau:



Der Proteintransfer erfolgte 45min bei 400 mA. Zur Kontrolle der Transfereffizienz wurde die Nitrocellulosemembran nach dem Transfer kurz mit Amidoschwarz-Lösung gefärbt (Entfärben mit Wasser).

### 2.2.2.6 Identifizierung von Proteinen mittels Immunodetektion

1x PBS: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> • 2 H<sub>2</sub>O, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7,2

Blocklösung: PBS, 10% Pferdeserum, 5% Milchpulver, 0,4% Tween-20

Waschlösung: PBS, 0,4% Tween-20

Antikörper-Verdünnungs-Lösung: PBS, 2% Milchpulver, 0,1% Tween-20

ECL-Reagenz: 20 ml 100 mM Tris pH 8,5, 44 µl 90 mM Coumarinsäure, 100 µl 250 mM Luminol (3-Aminophthalhydrazid in DMSO), 6 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen wurde die Nitrocellulosemembran ü.N. bei 4°C in Blocklösung inkubiert. Die Inkubation der Membran mit der ersten Antikörperlösung erfolgte für 1h bei RT. Nach viermaligem Waschen der Membran für je 15min in Waschlösung erfolgte die Inkubation der Membran mit dem zweiten Antikörper für 1h bei RT. Nach weiterem viermaligem Waschen der Membran erfolgte die Detektion in der Dunkelkammer. Hierzu wurde die Membran 1min in ECL-Reagenz inkubiert und luftblasenfrei in Folie verpackt. Die Peroxidasereaktion wurde mittels Röntgenfilm detektiert.

### 2.2.2.7 Aufreinigung von 20S Proteasomen

DEAE-Puffer A: 80 mM KAc, 5 mM MgAc, 10 mM HEPES pH 7,2, autoklavieren

DEAE-Puffer B: : 500 mM KAc, 5 mM MgAc, 10 mM HEPES pH 7,2, autoklavieren

FPLC-Puffer A: 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES pH 7,2, steril filtrieren und autoklavieren

FPLC-Puffer B: 1 M KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES pH 7,2, steril filtrieren und autoklavieren

Zellaufschluß: Die Präparation von 20S-Proteasom erfolgte aus 5x10<sup>8</sup> kultivierten Zellen. Das Zellpellet wurde in 10 ml eiskaltem DEAE-Puffer A, 0,1% TritonX-100 resuspendiert, in einen Dounce-Homogenisator überführt, mit 30 Stößen aufgeschlossen, 30min auf Eis inkubiert und im Sorvall-SS 34-Rotor für 30min bei 16000 rpm und 4°C zentrifugiert.

DEAE-Ionenaustausch-Chromatographie: Zur Äquilibration des Säulenmaterials wurden 10 ml DEAE-Sephacel in 40 ml DEAE-Puffer A aufgenommen, durchmischt und sedimentieren gelassen. Der Überstand wurde abgenommen und die Prozedur zweimal wiederholt mit anschließender Zentrifugation für 5min bei 800 g. Der Überstand des Zellysats wurde mit DEAE-Sephacel für 1h bei 4°C auf dem Drehschüttler inkubiert. Das Gemisch wurde in eine Chromatographie-Säule überführt, sedimentieren gelassen und mit ca. 40 ml DEAE-Puffer A gewaschen, bis kein Protein mehr eluierte (Tropfen auf Nitrocellulose-Membran mit Amidoschwarz getestet). Die Elution erfolgte mit 30 ml eiskaltem DEAE-Puffer B, wobei Fraktionen à 1,5 ml gesammelt wurden, welche auf einer Nitrocellulose-Membran mit Amidoschwarz auf ihren Proteingehalt getestet wurden. Die Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt wurden gepoolt und in einer Ultrafiltrations-Zelle (Filtermembran XM-300, 3x 30min in Aqua bidest. äquilibriert) bei einem Druck von 2-4 bar und einer Durchlaufgeschwindigkeit von max. 1 Tropfen / sec auf ein Endvolumen von 2 ml eingengt.

Dichtegradienten-Zentrifugation: Im Gradientenmischer wurden 2 Gradienten aus je 6,3 ml 10% Saccharose und 6,5 ml 40% Saccharose in DEAE-Puffer B angesetzt. Pro Gradient wurde 1 ml Protein-Probe aufgetragen. Die Zentrifugation erfolgte für 16h bei 40000 rpm und 4°C im Sorvall-SV 40-Rotor.

Fraktionierung, Aktivitäts-Test, Umpufferung und Einengung: Pro Gradient wurden 20 Fraktionen à 630 µl von oben abpipettiert. 10 µl jeder Fraktion wurden einem Protease-Assay mit dem fluorogenen Substrat Z-Gly-Gly-Leu-AMC in einer Endkonzentration von 50 µM unterzogen. Die 5 aktivsten Fraktionen wurden gepoolt, mit FPLC-Puffer A auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt und einer Einengung in einer Ultrafiltrations-Zelle auf ein Endvolumen von 5 ml unterzogen. Diese Umpufferung wurde zweimal wiederholt und die Proteinlösung in einem Endvolumen von 10 ml steril filtriert (Filtereinheit FP 30/0,2).

AKTA-FPLC: Die Proteinlösung wurde über den Superloop auf die MonoQ-Säule geladen und ein Gradient von 0 auf 20% FPLC-Puffer B in 4 min, von 20 auf 40% FPLC-Puffer B in 20min und von 40 auf 100% FPLC-Puffer B in 2min bei einer Flußrate von 1 ml/min, einem Maximaldruck von 4 MPa und einer Fraktionsgröße von 1 ml gefahren. Anschließend wurde erneut ein Aktivitäts-Test durchgeführt und die aktivsten Fraktionen auf Eis gelagert. Die Reinheit der Proteasomen wurde über SDS-PAGE und Coomassiefärbung überprüft und die Proteinkonzentration bestimmt.

#### 2.2.2.8 Proteaseassay mit fluorogenen Substraten

Substrate: Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, Bz-Val-Gly-Arg-AMC, Z-Leu-Leu-Glu-βNa, Z-Gly-Gly-Leu-AMC (Stocklösungen 10 mM in DMF)

Substratpuffer: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, autoklavieren

Der Versuchs-Ansatz erfolgte auf Eis. Pro Messung wurden 50-100 ng Proteasom mit dem Substrat in der angegebenen Konzentration für die angegebene Zeitdauer bei 37°C in einer 96 well Mikrotiterplatte inkubiert. Für Versuche zur Substratabhängigkeit wurden Dreifachwerte ermittelt. Für die Inhibitions-Versuche wurde das Proteasom vor Substratzugabe 30min bei RT mit dem entsprechenden Peptid in der angegebenen Konzentration inkubiert. Die Fluoreszenz der durch das Proteasom vom Substrat abgespaltenen chromophoren Gruppe wurde im Fluorimeter bei einer Anregung von 390 nm (AMC) bzw. 355 nm (βNa) und einer Emission von 460 nm (AMC) bzw. 405 nm (βNa) gemessen. Die Verstärkung (*gain*) betrug 30, die Anzahl der Blitze 10.

#### 2.2.2.9 Durchführung und Analyse proteolytischer Verdaus

*In vitro* Verdau eines Peptids mit 20S Proteasomen

10x Verdaupuffer: 200 mM HEPES pH 7,8, 20 mM MgAc<sub>2</sub>, 20 mM DTT

Ansatz: 1 µg Proteasom, 5 µg Peptid, 10 µl 10x Verdau-Puffer, Bidest ad 100 µl

Der *in vitro* Verdau erfolgte bei 37°C für die angegebene Zeitdauer. Für die Inhibitions-Versuche wurde das Proteasom vor Zugabe des zu verdauenden Peptids 30min bei 37°C mit dem

entsprechenden inhibitorischen Peptid in der angegebenen Konzentration inkubiert. Der Verdau wurde durch Zugabe von 0,1% TFA und Einfrieren bei -20°C gestoppt.

#### HPLC-Analyse der Verdauprodukte

HPLC-Puffer A: HPLC-Wasser, 0,1% TFA, entgast

HPLC-Puffer B: HPLC-Acetonitril, 0,1% TFA, entgast

Die Analyse der Verdauprodukte erfolgte zunächst über HPLC. 20 µl Probe wurden auf die Micra NPS ODS-I -Säule aufgetragen und bei einer Flußrate von 1 ml/min nach folgendem Gradienten aufgetrennt:

0-30% HPLC-Puffer B in 30min und 30-100% HPLC-Puffer B in 2min

#### Massenspektrometrie-Analyse der Verdauprodukte

Wenn in der HPLC-Analyse Verdauprodukte nachgewiesen werden konnten, wurden diese von Kathrin Textoris-Taube über ESI weitergehend untersucht. 20 µl Probe wurden mittels RP-HPLC aufgetrennt (SMART System ausgestattet mit einer µRPC C2/C18 SC 2.1/10 Säule, Pharmacia). Eluent A: 0,05% TFA; Eluent B: 70% Acetonitril 0,045% TFA; Gradient 5-63% Eluent B in 30min und 63-95% Eluent B in 4min; Flußrate 50 µl/min. Die aufgetrennten Peptidfragmente wurden direkt am Tandemquadrupol Massenspektrometer (ESI electrospray ion source TSQ 7000, Finnigan MAT) gemessen ( $m/z$  = 300-1300 in 3 sec). Die Peptidfragmente wurden anhand ihrer molekularen Masse identifiziert.

### 2.2.3 Zellkultur

#### 2.2.3.1 Zellen

Linien:	HeLa (humane Cervixcarcinom-Zellen) T2 (humane T-B-Lymphoblasten-Hybride HLA-A2.1 <sup>+</sup> TAP <sup>-</sup> LMP2 <sup>-</sup> LMP7 <sup>-</sup> ) NIH-3T3 (murine embryonale Fibroblasten)
Transfektanten:	T2.27 (T2, LMP2 <sup>+</sup> LMP7 <sup>+</sup> , 1 mg/ml G418, Dr. U. Kuckelkorn) NIH-3T3-HHD (NIH-3T3, HHD <sup>+</sup> , 200 µg/ml G418, T. Schirrmann) RMA-S-HHD (murine T-Zell-Lymphomlinie, TAP <sup>-</sup> , HHD <sup>+</sup> , 500 µg/ml G418, Dr. F. Lemonnier)
Primärzellen:	Lymphozyten aus der Milz von HHD-Mäusen

#### 2.2.3.2 Zellkulturmedien

humane Zelllinien, RMA-S:	RPMI
NIH-3T3:	DMEM, 50 µM beta-Mercaptoethanol
primäre Mauszellen:	RPMI, 50 µM beta-Mercaptoethanol, 10% TCGF
Ca/Mg-freies Medium:	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 12 H <sub>2</sub> O, 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 80 µM EDTA, 0,5% Phenolrot, sterilfiltriert
Einfrier-Medium:	Zellkulturmedium, 40% FCS, 10% DMSO
Auftau-Medium:	Zellkulturmedium, 20% FCS

#### 2.2.3.3 Kultur

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Wasserdampf kultiviert. Das entsprechende Zellkulturmedium wurde -falls nicht anders angegeben- mit 10% hitzeinaktiviertem FCS (30min 56°C), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin versetzt. Vor dem Ernten wurden adhärenente Zellen mit PBS gewaschen. Das Ablösen adhärenter Zellen erfolgte mit Trypsin / EDTA 1:4 verdünnt in PBS, im Falle von NIH-3T3-Zellen mit Ca/Mg-freiem Medium. Zentrifugationen wurden für 5min bei 300 g und 4°C durchgeführt.

#### 2.2.3.4 Einfrieren und Auftauen

$1 \times 10^6$  Zellen einer Zelllinie bzw.  $5 \times 10^7$  murine Milzzellen wurden pelletiert, in 1 ml eiskaltem Einfriermedium aufgenommen, in Einfrierröhrchen überführt und anschließend in einer eisgekühlten Isopropanol-Einfrierbox bei  $-80^\circ\text{C}$  ü.N. eingefroren (ca.  $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ ). Die Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Das Auftauen erfolgte unter leichtem Schwenken im  $37^\circ\text{C}$  Wasserbad, bis nur noch ein kleiner Eisklumpen sichtbar war. Die Zellen wurden in ein 15 ml Röhrchen überführt, tropfenweise wurde eiskaltes Medium mit 20% FCS zugegeben. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und in frischem Medium kultiviert.

#### 2.2.3.5 Elektroporation von Plasmid-DNA

$3 \times 10^6$  HeLa-Zellen wurden in 300  $\mu\text{l}$  Serum-freiem RPMI aufgenommen und mit 20  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA in einer 4mm-Elektroporations-Küvette bei 210 V und 975  $\mu\text{F}$  elektroporiert. NIH-3T3-Zellen einer konfluenten 15cm Kulturplatte wurden in 300  $\mu\text{l}$  Serum-freiem RPMI aufgenommen und mit 40  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA in einer 4mm Elektroporationsküvette bei 220 V und 975  $\mu\text{F}$  elektroporiert. Die Zellen wurden anschließend auf einer 10cm Zellkulturplatte kultiviert.

#### 2.2.3.6 Test der Plasmid-Transfektanten mittels Fluoreszenzmikroskopie

Mit dem Plasmid pCI-GFP transient transfizierte adhärente Zellen wurden in einer 10 cm Zellkulturplatte mit einem autoklavierten Glas-Objektträger kultiviert. Nach 1-3 Tagen wurden die Zellen auf dem Objektträger mit PBS gewaschen und 30min bei RT mit PBS / 3,7% PFA fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Färbung mit DAPI (1,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS). Anschließend wurde der Objektträger mit einem Deckglas versehen, mit 3% Agarose versiegelt und die Zellen am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Hier wurde der Anteil der transfizierten grün fluoreszierenden Zellen an allen DAPI-markierten blau fluoreszierenden Zellen ermittelt.

### 2.2.4 Immunologische Methoden

#### 2.2.4.1 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen für die FACS-Analyse

FACS-Puffer zum Waschen und zur Antikörperversdünung: PBS, 0,5% BSA, 0,1%  $\text{NaN}_3$

Für die Analyse der Zelloberflächen-Expression von HHD bzw. Peptid-beladenem HLA-A2.1 wurden  $3 \times 10^5$  NIH-3T3-HHD- bzw. T2-Zellen in einer 96 well Rundbodenplatte mit 200  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer gewaschen (300g 5min  $4^\circ\text{C}$ ). Die Inkubation mit 50  $\mu\text{l}$  des ersten Antikörpers ( $\alpha$  HLA-A,B,C bzw.  $\alpha$  HLA-A2) erfolgte für 30min bei  $4^\circ\text{C}$ . Nach zweimaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit 50  $\mu\text{l}$  des zweiten Antikörpers Ziege  $\alpha$  Maus IgG-FITC für 30min bei  $4^\circ\text{C}$  im Dunkeln. Nach erneutem zweimaligem Waschen wurden die Zellen in 300  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer resuspendiert und die Fluoreszenz am FACSCalibur gemessen.

Für die Analyse der intrazellulären GFP-Expression nach transients Transfektion von HeLa-Zellen mit pCI-Plasmiden wurden die Zellen zweimal mit 200  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer gewaschen, in 300  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer resuspendiert und die Fluoreszenz am FACSCalibur gemessen.

#### 2.2.4.2 MHC-Peptid-Bindungsassay

##### 2.2.4.2.1 Bestimmung der Affinität eines Peptids an HLA-A2.1

T2-Zellen wurden in Serum-freiem Medium gewaschen und  $2 \times 10^5$  T2-Zellen / 100  $\mu\text{l}$  wurden in einer 96 well Zellkulturplatte in Serum-freiem Medium ü.N. mit 100 ng/ml humanem  $\beta_2\text{M}$  und ohne oder mit Peptid (Positivkontroll-Peptid: GILGFVFTL) in den Konzentrationen 100, 10, 1 und 0,1  $\mu\text{M}$  inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen 2x mit FACS-Puffer gewaschen und mit 50  $\mu\text{l}$  des  $\alpha$  HLA-A2 monoklonalen Antikörpers (1:50) für 30min bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach zweimaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit 50  $\mu\text{l}$  Ziege  $\alpha$  Maus-FITC (1:100) für 30min bei  $4^\circ\text{C}$  im

Dunkeln. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen und am FACSCalibur analysiert. Die mittlere Fluoreszenz-Intensität für jede Peptid-Konzentration nach Abzug der mittleren Fluoreszenz-Intensität ohne Peptid wurde bestimmt. Die Maximalbindung wurde definiert als die Bindung von 100 µM des Positivkontroll-Peptids. Für jede Peptid-Konzentration wurde die relative Affinität (RA) folgendermaßen bestimmt:  $RA = \frac{\text{Konzentration eines Peptids, die 20\% der Maximalbindung entspricht}}{\text{Konzentration des Positivkontroll-Peptids, die 20\% der Maximalbindung entspricht}}$ . Je niedriger die RA, desto stärker ist die Affinität. Der mittlere RA-Wert wurde für jedes Peptid in mindestens drei unabhängigen Experimenten ermittelt. In allen Experimenten wurden 20% der Maximalbindung durch das Positivkontroll-Peptid bei einer Konzentration von 1-3 µM erreicht (Tourdot 2000).

#### **2.2.4.2.2 Bestimmung der Stabilität der HLA-A2.1-Peptid-Bindung**

T2-Zellen wurden in Serum-freiem Medium gewaschen und  $2 \times 10^5$  T2-Zellen / 100 µl wurden in einer 96 well Zellkulturplatte in Serum-freiem Medium ü.N. mit 100 ng/ml humanem  $\beta_2M$  und ohne oder mit Peptid (Positivkontroll-Peptid: GILGFVFTL) in der Konzentration 100 µM inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen 4x mit Serum-freiem Medium gewaschen und mit 10 µg/ml Brefeldin A für 1h bei 37°C inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit Serum-freiem Medium wurden die Zellen für 0, 2, 4, 6 und 8h mit 0,5 µg/ml Brefeldin A inkubiert. Es folgte die Inkubation mit 50 µl des  $\alpha$  HLA-A2 monoklonalen Antikörpers (1:50) für 30min bei 4°C. Nach zweimaligem Waschen in FACS-Puffer erfolgte die Inkubation mit 50 µl Ziege  $\alpha$  Maus-FITC (1:100) für 30min auf Eis im Dunkeln. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen und am FACSCalibur analysiert. Die mittlere Fluoreszenz-Intensität für jedes Peptid zu jedem Zeitpunkt nach Abzug der mittleren Fluoreszenz-Intensität ohne Peptid zum entsprechenden Zeitpunkt wurde bestimmt. Der Dissoziationskomplex  $DC_{50}$  ist definiert als die Zeit, die benötigt wird, um 50% der HLA-Peptid-Komplexe vom Zeitpunkt  $t=0$  zu verlieren. Je höher  $DC_{50}$  desto stabiler ist die Bindung (Tourdot 2000).

#### **2.2.4.3 HHD-Mausmodell**

Das für die Immunisierungsstudien und zur Gewinnung von CTLs benutzte transgene Mausmodell wird als "HHD" (Human-Human-D<sup>b</sup>) bezeichnet. Es zeichnet sich durch die Expression eines chimären MHC Klasse I-Moleküls aus. Die Untereinheiten  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  sind humanen Ursprungs (HLA-A2.1). Die Untereinheit  $\alpha 3$  stammt aus der Maus (H2-D<sup>b</sup>). Zusätzlich ist das HHD-Mausmodell durch eine Deletion des murinen MHC Klasse I-Locus H2-Ia gekennzeichnet. Das murine  $\beta_2$ -Mikroglobulin ist durch ein humanes  $\beta_2M$  ersetzt, welches kovalent an den N-Terminus des chimären MHC Klasse I-Moleküls assoziiert ist.

#### **2.2.4.4 Gewinnung MUC1-spezifischer cytotoxischer T-Zellen aus HHD-Mäusen**

##### **2.2.4.4.1 Immunisierung von HHD-Mäusen**

Es sollten spezifische cytotoxische T-Zellen gegen das HLA-A2.1 restringierte Epitop MUC1<sub>950-958</sub> (STAPPVHNV) generiert werden. Die CTL-Generierung erfolgte im Labor von Dr. F.Lemonnier am Institut Pasteur, Paris. Vier Gruppen mit jeweils drei HHD-Mäusen wurden nach unterschiedlichen Protokollen immunisiert (Tab.4). Am Tag -21 erfolgte eine Injektion von  $2 \times 50 \mu\text{l}$  10 µM Cardiotoxin in jeden Oberschenkel vor der DNA-Immunisierung zur Anreicherung Antigen-präsentierender Zellen.

Tab. 4: Immunisierungsprotokolle zur Generierung MUC1<sub>950-958</sub>-spezifischer CTLs in HHD-Mäusen. Das Plasmid pCMV-B10-MUC1<sub>950-958</sub> wurde in PBS gelöst und intramuskulär zu je 50 µg in jeden Oberschenkel injiziert. Die Peptide wurden zu je 100 µg mit 140 µg T-Helferpeptid (I-A<sup>b</sup>-restringiertes HBVcore<sub>128-140</sub>) in Incomplete Freund's Adjuvant subcutan an der Schwanzbasis injiziert. d0 gilt als der Tag der Milzentnahme.

GRUPPE	1. IMMUNISIERUNG		2. IMMUNISIERUNG		<i>in vitro</i> RESTIMULATION
	Agens	Tag	Agens	Tag	
1	pCMV-B10-MUC1 <sub>950-958</sub>	d -18	Peptid MUC1 <sub>950-958</sub>	d -11	Peptid MUC1 <sub>950-958</sub>
2	pCMV-B10-MUC1 <sub>950-958</sub>	d -18	Peptid MUC1 <sub>950-958</sub> -P1Y	d -11	Peptid MUC1 <sub>950-958</sub> -P1Y
3	Peptid MUC1 <sub>950-958</sub>	d -11	-/-	-/-	Peptid MUC1 <sub>950-958</sub>
4	Peptid MUC1 <sub>950-958</sub> -P1Y	d -11	-/-	-/-	Peptid MUC1 <sub>950-958</sub> -P1Y

#### 2.2.4.4.2 Kultivierung cytotoxischer T-Zellen

Am Tag d0 wurden den Tieren die Milzen entnommen und mit dem sterilen Stempel einer Spritze in 5ml Medium zerstoßen. Nach Überführen in ein 15 ml Röhrchen und 5min Sedimentation wurde der Überstand zentrifugiert und die Zellen in einer 6 well Platte in je 5 ml Medium mit 10 µg/ml Peptid MUC1<sub>950-958</sub> bzw. MUC1<sub>950-958</sub>-P1Y kultiviert. Die Restimulation erfolgte wöchentlich mit 10 µg/ml Peptid und Gamma-bestrahlten (20min 3000rad) Milzzellen einer unbehandelten HHD-Maus als Stimulatoren. Ab dem Tag d9 erfolgte die Zugabe von 10% TCGF, einer aus dem Überstand von Ratten-Milzzell-Kulturen unter Concavalin A-Stimulation gewonnenen Mischung von Wachstumsfaktoren incl. IL-2.

#### 2.2.4.4.3 Klonierung cytotoxischer T-Zellen

Die Klonierung der MUC1<sub>950-958</sub>-spezifischen HHD-CTLs erfolgte am Tag 19 nach Inkulturnahme der Zellen. Als Stimulator-Zellen wurden frisch isolierte, gammabestrahlte (3000 rad) und MUC1<sub>950-958</sub>-beladene (5 µg/ml) Milzzellen aus HHD-Mäusen verwendet. Die CTLs wurden in Verdünnungen von 10 Zellen, 3 Zellen und 1 Zelle pro Kavität in 96 well Rundbodenplatten verteilt. Das Medium enthielt neben den üblichen Zusätzen auch TCGF (s.o.).

#### 2.2.4.5 Cytotoxizitätsassay

Mit Hilfe des cytotoxischen T-Zell-Assays läßt sich eine Aussage darüber treffen, wie effizient die spezifischen cytotoxischen T-Zellen ihre Zielzellen erkennen und lysieren bzw. in welchem Maße das Antigen, für das die cytotoxischen T-Zellen spezifisch sind, auf der Zelloberfläche der Zielzellen präsentiert wird. Das Prinzip des *chromium release assays* besteht darin, daß die mit radioaktivem <sup>51</sup>Chrom markierten Zielzellen durch die spezifischen T-Zellen lysiert werden, so daß die in das Medium freigesetzte Radioaktivität im Zellüberstand gemessen werden kann. Die prozentuale spezifische Lyse berechnet sich wie folgt: spezifische Lyse – spontane Lyse / maximale Lyse – spontane Lyse. Die spontane Lyse ergibt sich aus der freigesetzten Radioaktivität in Abwesenheit cytotoxischer T-Zellen (nur Medium). Die maximale Lyse ergibt sich aus der freigesetzten Radioaktivität in Anwesenheit von 1% Triton X oder 1N HCl im Medium.

Der Assay erfolgte stets sechs Tage nach in vitro Kultivierung bzw. Restimulierung der CTLs. Die Zielzellen wurden im Fall von RMA-S-HHD am Vorabend zur Stabilisierung ihrer HHD-Moleküle (in Medium ohne FCS) auf RT gestellt. Für den Assay wurden ca. 2x10<sup>6</sup> Zellen 1x mit Serum-freiem Medium gewaschen und dann für 1h bei RT in 5 ml Serum-freiem Medium mit 10 µg/ml Peptid inkubiert (MUC1<sub>950-958</sub>, MUC1<sub>950-958</sub>-P1Y oder als stabilisierendes Negativkontroll-Peptid HIV1-Pol<sub>464-472</sub>). Nach 1x Waschen in Medium wurden die Zellen in 120 µl FCS aufgenommen und für 90min bei 37°C mit 50 µCi <sup>51</sup>Cr markiert. Anschließend wurden die Zellen 3x mit Medium gewaschen und in einer Konzentration von 5000 Zellen / 100 µl aufgenommen. Zu den Zielzellen wurde noch einmal das jeweilige Peptid in einer Konzentration von 1 µg / 100 µl gegeben (Endkonzentration im



Assay 5 µg/ml). In eine 96 well Rundbodenplatte wurden jeweils 100 µl der Zielzellen incl. Peptid vorgelegt. Die CTLs von je drei Kavitäten einer 6 well Platte wurden 3x mit Medium gewaschen, in vier Schritten verdünnt (1:1, 1:3, 1:9, 1:27) und je 100 µl zu den Zielzellen gegeben. Nach einer Inkubation für 4h bei 37°C wurden die Zellen abzentrifugiert und je 50 µl des Überstands in einem Gammacounter gemessen. Für jeden Meßwert wurden Dreifachwerte ermittelt, für die spontane und die maximale (100 µl 1N HCl) Lyse Zwölfachwerte.

#### **2.2.4.6 Immunisierung von HHD-Mäusen mit Plasmid-DNA**

Zur Ermittlung der cytotoxischen T-Zell-Antwort auf die Immunisierung mit dem Plasmid pCI wurden 7-8 HHD-Mäuse pro Gruppe im Alter zwischen 6 und 10 Wochen verwendet. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit dem EndoFree Plasmid Giga Kit. Die DNA wurde in autoklaviertem PBS in einer Konzentration von 1 mg/ml aufgenommen. 50 µg DNA wurden 3x im Abstand von jeweils 2 Wochen in jeden Oberschenkel injiziert. Nach weiteren 2 Wochen wurden den Mäusen die Milzen entnommen, wie zuvor beschrieben in Einzelzellkultur genommen und eingefroren.

#### **2.2.4.7 Maus IFN $\gamma$ Sekretionsassay**

Wegen der geringen CTL-Frequenz in HHD-Mäusen und der geringen zu erwarteten Frequenz MUC1<sub>950-958</sub>-spezifischer CTLs nach Plasmid-Immunisierung wurden die Milzzellen vor der Ermittlung der IFN $\gamma$ -Sekretion eine Woche lang mit IL-2 restimuliert. Der IFN $\gamma$ -Sekretions-Assay wurde dann entsprechend der Anleitung des Herstellers durchgeführt.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 PROTEASOMALE *IN VITRO* PROZESSIERUNG SYNTHETISCHER POLYPEPTOPE

Das Proteasomensystem ist für die Generierung der meisten antigenen Peptide verantwortlich, die auf MHC Klasse-I-Molekülen zur Erkennung durch CTLs präsentiert werden (Cerundolo *et al.* 1997; Craiu *et al.* 1997; Kloetzel 2001; Rock *et al.* 1994). Für einige dieser Peptide konnte gezeigt werden, daß ihre *in vitro* Prozessierung durch das 20S Proteasom den zellulären proteasomalen Abbau sowohl qualitativ als auch quantitativ widerspiegelt (Eggers *et al.* 1995; Schwarz *et al.* 2000; Sijts *et al.* 2000). Vor der Klonierung eines Polyepitop-Plasmids sollte daher geklärt werden, ob die durch das Plasmid codierten Einzelepitope *in vitro* proteasomal prozessiert und freigesetzt werden.

##### 3.1.1 Entwurf verschiedener Polyepitope aus Tumor-assoziierten Antigenen

Die für die vorliegende Arbeit gewählten Epitope sind HLA-A2.1-restringiert und entstammen drei verschiedenen Tumor-assoziierten Antigenen: der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase (hTERT), dem Glykoprotein MUC1 und dem Protein WT1 (Wilms Tumor). Von MUC1 wurden zwei natürlich vorkommende Epitope gewählt, die sich durch den Austausch von zwei Aminosäuren an den Positionen P6 (A→V) und P8 (G→N) unterscheiden (Tab.5).

Tab. 5: Sequenz, Position und Gewebeverteilung der für die Synthese von Polyepitopen verwendeten Tumor-assoziierten Antigene.

ANTIGEN (POSITION)	EPITOPSEQUENZ	GEWEBEVERTEILUNG TUMOR	GEWEBEVERTEILUNG NORMAL	REFERENZ
<b>HTERT (540-548)</b>	ILAKFLHWL	Lungen-, Prostata- u. Ovarialkarzinom, Multiples Myelom, Melanom, akute Leukämien, Non-Hodgkin- Lymphom	Hämatopoetische Stammzellen, Keimzellen, basale Keratinozyten, proliferative Epithelzellen	Vonderheide 1999 Minev 2000
<b>MUC1 (9-17)</b>	STAPPAHGV	Brust- und Ovarialkarzinom, Multiples Myelom, B-Zell-Lymphom	epitheliale Gewebe	Domenech 1995 Apostolopoulos 1997
<b>MUC1 (950-958)</b>	STAPPVHNV	s.o.	s.o.	Brossart 1999
<b>WT1 (235-243)</b>	CMTWNQMNL	akute Leukämien, chronisch myeloische Leukämien	Milzkapsel u. -stroma, Sertoli- u. Granulosazellen	Oka 2000

Es wurden zehn verschiedene Polyepitope von 24 bis 37 Aminosäuren Länge synthetisiert (Tab.6). In den meisten Fällen wurden die Epitope Perlenketten-artig ohne intervenierende Sequenzen aneinander gereiht (Pep161, 171, 194, 173, 186 und 105). Die Generierung eines

MHC Klasse I-Epitops durch das Proteasom kann jedoch auch von flankierenden Sequenzen beeinflusst werden (Holzhutter *et al.* 1999; Theobald *et al.* 1998). Daher wurde ein hTERT<sub>540-548</sub>-Polyepitop (Pep166) mit der Spacersequenz „GGY“ versehen, die sich begünstigend auf die Epitopgenerierung auswirken sollte. Der Schnitt nach der Aminosäure Tyrosin (Y) wird bevorzugt durch die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität der  $\beta$ 5-Untereinheit des Proteasoms durchgeführt.  $\beta$ 5 würde in diesem Fall den N-Terminus des Epitops generieren. Glycin (G) an der C-terminalen Position hinter einem Schnitt übt eine verstärkende Wirkung auf den Schnitt selbst und damit auf die Generierung des C-Terminus des Epitops aus. Das Epitop hTERT<sub>540-548</sub> wurde außerdem sowohl in seinem physiologischen Sequenzkontext (Pep165) als auch im Sequenzkontext des Polypeptids pp89<sub>162-186</sub> synthetisiert (Pep170). Das 25mer Polypeptid aus dem murinen CMV Protein pp89 enthält das antigene Nonapeptid pp89<sub>186-176</sub> und ist bezüglich seiner proteasomalen Degradationsprodukte hinlänglich analysiert (Boes *et al.* 1994). Die Sequenz des pp89-Epitops wurde durch die des hTERT-Epitops ersetzt, um dessen Generierung im fremden Aminosäurekontext zu untersuchen. Außerdem wurde das hTERT-Epitop mit Spacer-Sequenzmotiven aus dem pp89<sub>162-186</sub> Polypeptid (GPS - RLMY) versehen (Pep181).

Tab. 6: Sequenzen der Polyepitope aus Tumor-assoziierten Antigenen, die zur Untersuchung ihrer Abbauprodukte einer 20S proteasomalen *in vitro* Degradation unterzogen wurden.

PEPTID	SEQUENZ	BESCHREIBUNG
Pep 161	ILAKFLHWL ILAKFLHWL ILAKFLHWL ILAKFLHWL	4xhTERT <sub>540-548</sub>
Pep 166	MLMYILAKFLHWLGGYILAKFLHWLGGYILAKFLHWL	3xhTERT <sub>540-548</sub> mit GGY-Spacern
Pep 165	AEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVEL	hTERT <sub>540-548</sub> in physiol. Sequenz
Pep 170	RLMYDILAKFLHWLGPSEKRVWMS	hTERT <sub>540-548</sub> in pp89-Sequenz
Pep 181	RLMYILAKFLHWLGPSRLMYILAKFLHWLGPS	2xhTERT <sub>540-548</sub> mit pp89-Spacern
Pep 171	AHGVILAKFLHWLSTAPPAHGVILAKFLHWLSTAPPA	2xhTERT <sub>540-548</sub> mit MUC1 <sub>9-17</sub>
Pep 194	VHNVILAKFLHWLSTAPPVHNVILAKFLHWLSTAPPV	2xhTERT <sub>540-548</sub> mit MUC1 <sub>950-958</sub>
Pep 173	QMNLILAKFLHWLQMTWNQMNLILAKFLHWLQMTW	2xhTERT <sub>540-548</sub> mit WT1 <sub>235-243</sub>
PEP 186	MLMY STAPPAHGV STAPPAHGV STAPPAHGV	3xMUC1 <sub>9-17</sub>
PEP 105	MLRMD STAPPVHNV STAPPVHNV STAPPVHNV	3xMUC1 <sub>950-958</sub>

### 3.1.2 20S proteasomale *in vitro* Degradation der Polyepitope

Zur Ermittlung ihrer Degradationsprodukte wurden die Polyepitope einer *in vitro* Prozessierung mit 20S konstitutiven und Immunoproteasomen unterzogen. Konstitutive Proteasomen wurden aus humanen T2-Zellen isoliert. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine Deletionsmutante, die sich durch das Fehlen des MHC Klasse II-Locus auszeichnet und die daher unter anderem defizient für die Gene LMP-2 und LMP-7 ist. Immunoproteasomen entstammten aus T2.27-Zellen, die stabil mit den Genen für diese beiden Immununtereinheiten transfiziert und durch einen verstärkten Einbau der MECL1-Untereinheit charakterisiert sind (Abb.9) (Kuckelkorn *et al.* 1995).

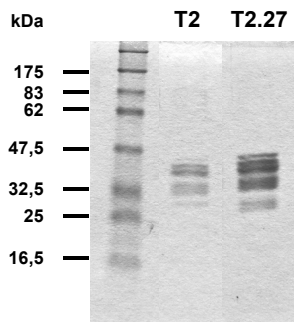


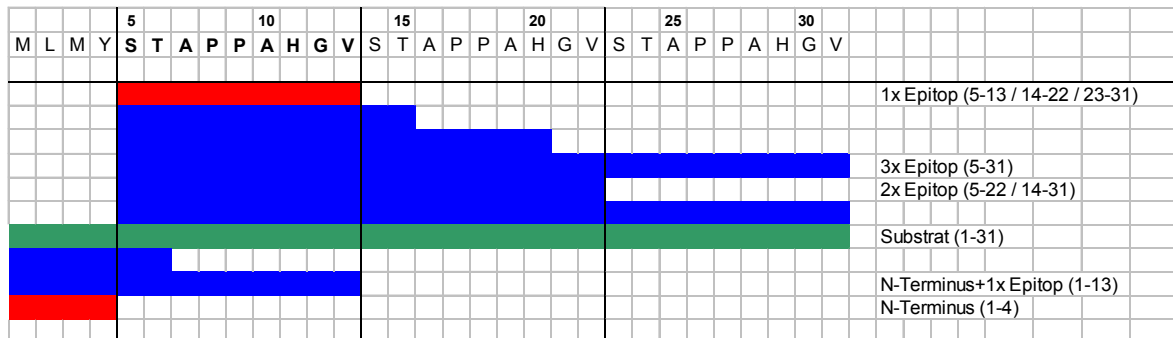
Abb. 9: SDS-PAGE und Coomassie-Färbung der aus T2- und T2.27-Zellen isolierten Proteasomen. Es wurden keine kontaminierenden Banden detektiert. Die verschiedenen Bandenstärken beruhen auf unterschiedlichen Mengen des eingesetzten Proteins (0,5 µg T2 bzw. 1,5 µg T2.27).

*In vitro* Versuche mit kurzen fluorogenen Peptidsubstraten demonstrierten, daß durch den  $\beta 1 \rightarrow \beta 1i$ -Austausch die immunoproteasomale Schnittpräferenz nach sauren Resten stark reduziert ist und die beiden anderen Schnittaktivitäten  $\beta 2i$  und  $\beta 5i$  nach basischen und hydrophoben Resten variieren (Gaczynska *et al.* 1993). Der immunoproteasomale Einfluß auf längere Peptidsubstrate stellt sich jedoch komplexer dar und läßt sich nicht eindeutig definieren (Toes *et al.* 2001). Durch die Verwendung beider 20S-Typen sollte sichergestellt werden, daß ein Tumorepitop *in vivo* sowohl von professionellen APCs als auch von Tumorzellen unabhängig von ihrer proteasomalen Ausstattung generiert werden kann. Die Polyepitope wurden einer Verdaukinetik von 0,5h bis 16h unterzogen und ihre Degradationsprodukte mittels RP-HPLC-ESI und Ionenfallen-Massenspektrometrie analysiert.

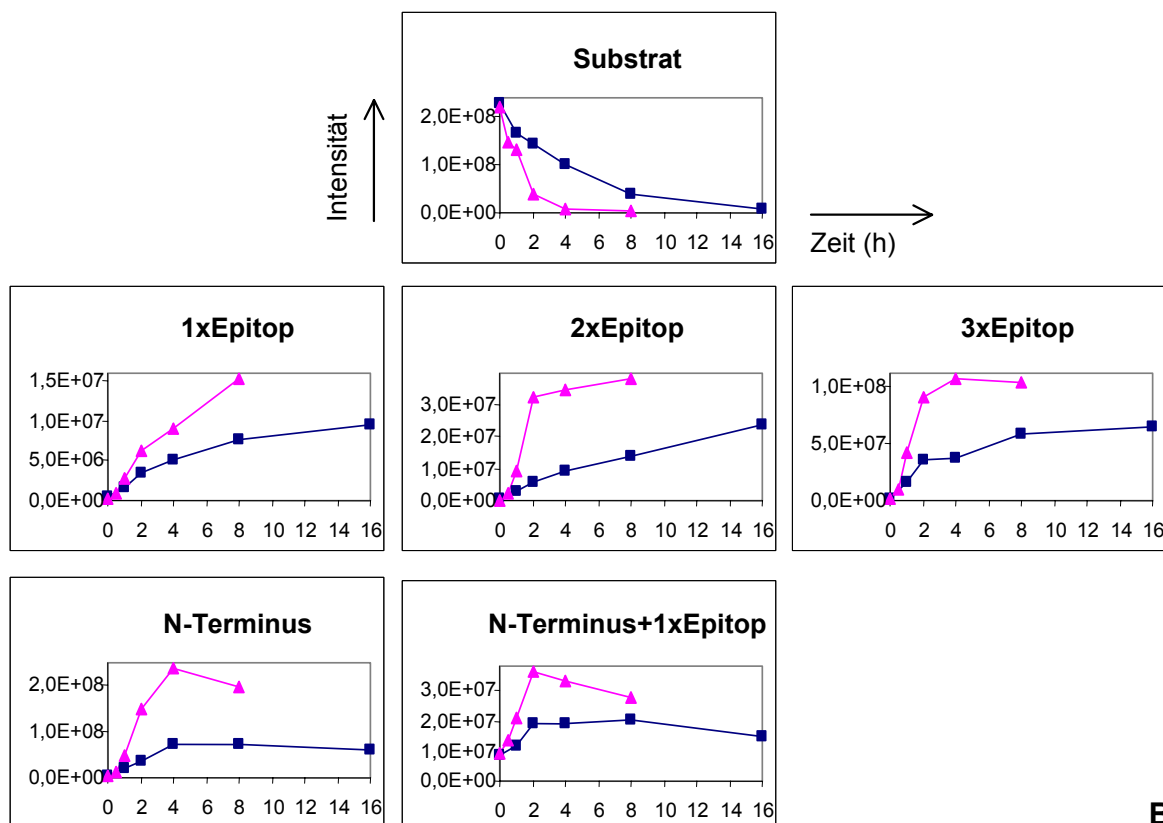
Acht der in Tabelle 6 vorgestellten Peptide zeichnen sich dadurch aus, daß ihnen die Sequenz für das Epitop hTERT<sub>540-548</sub> (ILAKFLHWL) gemeinsam ist. Keines dieser Peptide wurde *in vitro* proteasomal degradiert, weder von konstitutiven noch von Immunoproteasomen. Da die Generierung einiger Epitope PA28-abhängig erfolgt (Murata *et al.* 2001; Sun *et al.* 2002), wurde exemplarisch das Peptid Pep194 zusätzlich mit dem Proteasomenaktivator PA28 inkubiert. Auch in diesem Fall wurde kein Abbau verzeichnet. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, daß die hTERT-Peptide eine inhibitorische Wirkung auf die proteasomale Aktivität ausüben könnten. Verschiedene experimentelle *in vitro* und *in vivo* Ansätze konnten diese Hypothese bestätigen und spezifizieren. Auf die entsprechenden Versuchsanordnungen soll jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht näher eingegangen werden.

Die beiden Peptide, die sich aus einer Folge von MUC1-Epitopen zusammensetzen (Pep186 und Pep105; Tab.6; siehe auch Klappentext), wurden *in vitro* sehr effizient proteasomal

degradiert. Abbildungen 10A und 11A stellen die Schnittkarten der Peptide dar, die sich aus den generierten Fragmenten beider Proteasomentypen zu den Zeitpunkten 4h (T2.27) bzw. 8h (T2) zusammensetzen. Die relevanten Degradationsprodukte (Epitop, Vorläufer und flankierende Sequenzen) wurden mittels MS/MS-Analyse identifiziert und im Zeitverlauf quantifiziert (Abb.10B, 11B). Zum Vergleich der Produktgenerierung durch die beiden Proteasomentypen wurden diejenigen Zeitpunkte herangezogen, zu denen 50% des Substratabbaus erfolgt war.



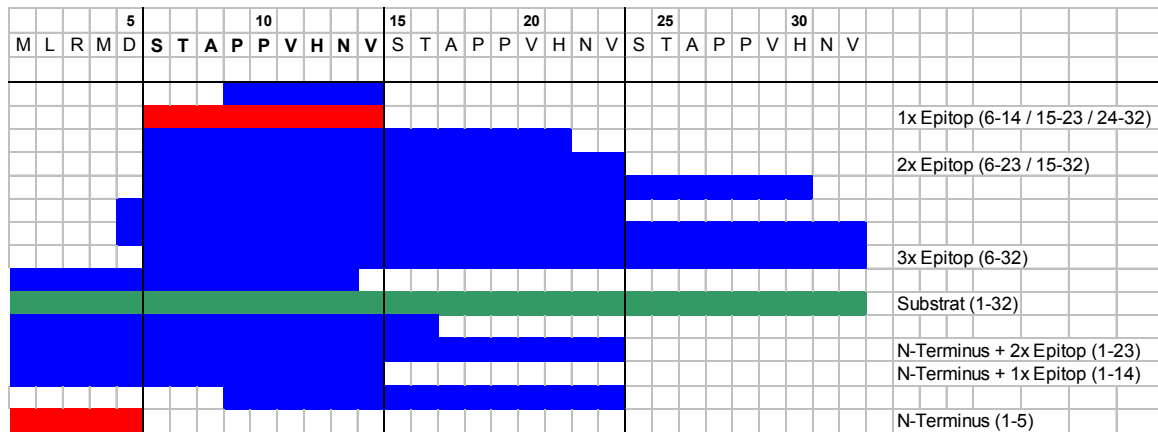
**A**



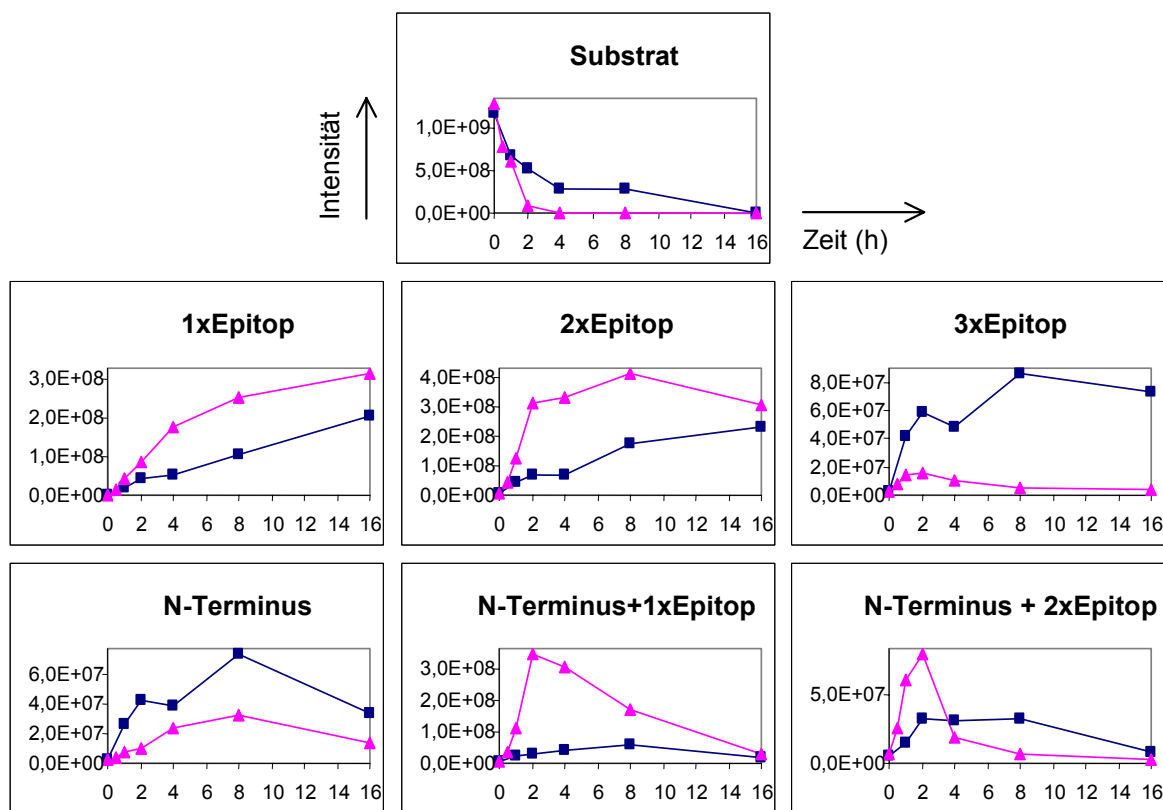
# B

Abb. 10: 20S proteasomale *in vitro* Degradation des Polyepitops Pep186. (A) Vollständige Schnittkarte. Rot: Epitop bzw. N-Terminus; grün: Substrat. (B) Ausgewählte Kinetiken von Substratabbau und Fragmentgenerierung. Blau: T2-Proteasom; pink: T2.27-Proteasom.

Das Substrat Pep186 wurde durch das Immunoproteasom ca. 2,5x schneller degradiert als durch das konstitutive Proteasom (Tab.7). Erwartungsgemäß zeigte das Immunoproteasom eine höhere Turnover-Rate. Das Epitop wurde von beiden Proteasomentypen mit annähernd gleicher Effizienz generiert und auch im Verlauf der 16h-Kinetik nicht wieder degradiert. Die Epitopgenerierung konnte sowohl aus dem Substrat selbst wie aus vielen seiner Abbauprodukte erfolgen. Diese relevanten Abbauprodukte, unter anderem N-Terminus+1xEpitop (1-13), 2xEpitop (5-22 / 14-31) und 3xEpitop (5-31), wurden durch das Immunoproteasom 1,5-2,3x schneller generiert als durch das konstitutive. Die Kinetik der Produktgenerierung korrelierte -mit Ausnahme des Epitops- mit der Kinetik des Substratabbaus. Dies läßt sich besonders gut am Beispiel der immunoproteasomalen Degradation festmachen, bei der nach 2-4h das Substrat verbraucht war und gleichzeitig die Produktmenge ihr Plateau erreicht hatte oder wieder leicht abnahm. Zwei Schnittstellen innerhalb von Pep186 führten zu einer Zerstörung des Epitops. Sie sind an den Aminosäuren Threonin und Histidin lokalisiert.



A



B

Abb. 11: 20S proteasomale *in vitro* Degradation des Polyepitops Pep105. (A) Vollständige Schnittkarte. Rot: Epitop bzw. N-Terminus; grün: Substrat. (B) Ausgewählte Kinetiken von Substratabbau und Fragmentgenerierung. Blau: T2-Proteasom; pink: T2.27-Proteasom.

Das Substrat Pep105 wurde basierend auf dem Zeitpunkt des 50%igen Substratabbaus vom Immunoproteasom nur ca. 1,5x schneller degradiert als vom konstitutiven Proteasom (Tab.7). Generell erfolgte sein Abbau schneller als der des Substrats Pep186. Das Epitop wurde auch im Fall von Pep105 von beiden Proteasomentypen mit etwa gleicher Effizienz prozessiert, ohne im Verlauf der 16h-Kinetik wieder abgebaut zu werden. Die Generierung der anderen

relevanten Abbauprodukte unterschied sich in dreierlei Hinsicht von der Fragmentbildung des Substrats Pep186:

- Erstens erfolgte die Generierung des N-Terminus (1-5, MLRMD) und damit gleichzeitig die des 3-fachen Epitops (6-32) durch das Immunoproteasom weniger effizient als durch das konstitutive Proteasom. Dies läßt sich durch die Sequenz des N-Terminus und den Austausch der  $\beta$ 1- durch die  $\beta$ 1i-Untereinheit erklären.  $\beta$ 1i zeichnet sich durch eine starke Reduzierung der Caspase-ähnlichen Aktivität aus (Gaczynska *et al.* 1993), so daß Immunoproteasomen eine verminderte Fähigkeit besitzen, nach sauren Aminosäuren -hier: Glutamat (D)- zu schneiden.
- Der zweite auffällige Unterschied zwischen Pep186 und Pep105 besteht in der sehr starken Generierung der beiden Pep105-Spaltprodukte N-Terminus+1xEpitop (1-14) und N-Terminus+2xEpitop (1-23) durch das Immunoproteasom. Beide Produkte wurden nach 2h wieder vollständig degradiert. Wie zuvor beschrieben entspricht dieser Zeitpunkt dem Moment, an dem das Substrat verbraucht ist. Der Abbau könnte im Fall des Produkts N-Terminus+2xEpitop (1-23) durch einen Schnitt nach Valin (14) erfolgen, so daß das Produkt N-Terminus+1xEpitop (1-14) entsteht. Dieses wird -wie zuvor erläutert- vom Immunoproteasom nicht zu den beiden Produkten N-Terminus (1-5) und Epitop (6-14) prozessiert. Stattdessen konnten verschiedene Schnittstellen identifiziert werden, die das Epitop zerstören. Zwei dieser Schnitte liegen wie im Substrat Pep186 hinter den Aminosäuren Histidin und Threonin. Auch nach Asparagin, welches in Pep186 nicht vorkommt, konnte ein proteasomaler Schnitt nachgewiesen werden, der zur Zerstörung des Epitops führt.
- Der dritte Unterschied zwischen Pep186 und Pep105 bestand in einem Schnitt nach der Aminosäure Alanin an Position P3 des Epitops, die in beiden Substraten enthalten ist. Nur bei Pep105 konnte ein Schnitt nach Alanin nachgewiesen werden. Dies kann zwei mögliche Ursachen haben, die beide darin begründet liegen, daß sich C-terminal des Alaninrestes unterschiedliche Aminosäuren befinden. Entweder fand auch in Pep186 eine Spaltung nach Alanin statt, deren Spaltprodukte jedoch massenanalytisch nicht nachgewiesen werden konnten, oder es wurde durch die veränderten C-terminal flankierenden Aminosäuren eine Spaltung verhindert.

Generell konnte durch die massenanalytischen Untersuchungen gezeigt werden, daß beide MUC1-Epitope von beiden Proteasomentypen mit ähnlicher Effizienz generiert wurden. Der Abbau von Pep105 erfolgte jedoch schneller, weshalb dieses Polyepitop für die folgenden Versuche favorisiert wurde.



Tab. 7: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Verdau-Kinetiken der Peptide Pep186 und Pep105.

<b>POLYEPITOP</b>	<b>PEP186</b>		<b>PEP105</b>	
<b>PROTEASOM</b>	<b>T2</b>	<b>T2.27</b>	<b>T2</b>	<b>T2.27</b>
<b>50% SUBSTRATABBAU</b>	3,5 h	1,5 h	1,5 h	1 h
<b>-FACH SCHNELLERE GENERIERUNG DURCH T2.27:</b>				
<b>1XEPITOP</b>	0,9		1,4	
<b>2XEPITOP</b>	2,3		2,2	
<b>3XEPITOP</b>	1,8		0,3	
<b>N-TERMINUS</b>	1,6		0,2	
<b>N-TERMINUS+1XEPITOP</b>	1,5		4,2	
<b>N-TERMINUS+2XEPITOP</b>	-/-		2,6	

### 3.2 PROTEASOMALE *IN VIVO* PROZESSIERUNG UBIQUITIN-FUSIONIERTER POLYEPITOPE

Die proteasomale Degradation intrazellulärer Proteine hängt nach heutigem Kenntnisstand in den meisten Fällen von der kovalenten Verknüpfung von Ubiquitin an das Proteinsubstrat ab. Über die Carboxylgruppe seines C-terminalen Glycins (G76) wird ein Ubiquitinmolekül an die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Substrat-internen Lysinrests gebunden. Es dient als Anker für die Anheftung weiterer aktivierter Ubiquitinmoleküle an seinen Lysinrest K48. Diese Polyubiquitinierung wird als Degradationssignal vom 26S Proteasom erkannt (Ciechanover 1998; Goldberg and Rock 1992; Hochstrasser 1995; Ulrich 2002). Varshavsky konnte bereits vor zehn Jahren zeigen, daß Ubiquitin am N-Terminus linearer Fusionsproteine sowohl eine Erkennung durch E3 Ubiquitinligasen als auch eine Anheftung weiterer Ubiquitinmoleküle ermöglicht und den Abbau des Fusionsproteins durch das 26S Proteasom vermittelt (Johnson *et al.* 1995). Verschiedene Untersuchungen, die sich mit dem Einsatz von Plasmiden zur DNA-Immunisierung beschäftigten, nutzten daher die Generierung von Fusionskonstrukten aus Ubiquitin und einem antigenen Proteinsubstrat, um das Protein zum proteasomalen Abbauweg zu befördern und seine Epitope der MHC Klasse I-restringierten Präsentation zugänglich zu machen (Referenzen vgl. Tab.8).

#### 3.2.1 Herstellung von Plasmiden für Ubiquitin-fusionierte MUC1-Polyepitope

Aufgrund seiner besonders effizienten proteasomalen Generierung wurde das Epitop MUC1<sub>950-958</sub> für die folgenden Versuche ausgewählt. Die DNA-Sequenz für MUC1<sub>950-958</sub> wurde viermal hintereinander ohne intervenierende Sequenzen in den Mammalia Expressionsvektor pCI mit starkem CMV-Promotor und immunstimulatorischer CpG-Sequenz ligiert (Abb.12). Der Vektor zeichnet sich durch seine hohe Proteinexpression in Mammaliazellen aus und wurde bereits in mehreren Vakzinierungsstudien gegen tumorale

und virale Pathogene eingesetzt (Bahloul *et al.* 1998; Johnen and Pecher 2002; Wild *et al.* 1999).

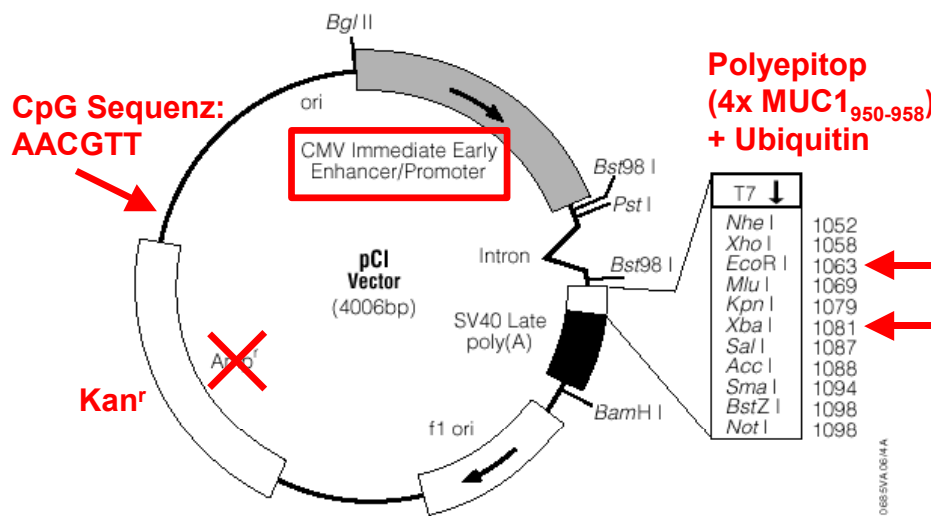


Abb. 12: Aufbau des Mammalia Expressionsvektors pCI (Promega) und Darstellung der Klonierungen (rot) (Abb. nach [http://www.promega.com/vectors/mammalian\\_express\\_vectors.htm](http://www.promega.com/vectors/mammalian_express_vectors.htm)).

Für die vorliegende Arbeit wurden vier verschiedene Polyepitop-Plasmide mit N- oder C-terminaler Ubiquitininfusion hergestellt, um den Effekt der unterschiedlichen Ubiquitinierung auf die Abbaurate des Polyepitops zu untersuchen (Tab.8).

- Im UbG76-Konstrukt schneiden deubiquitinierende Enzyme (DUBs) hinter der Position G76 des Ubiquitinmonomers (Jentsch and Schlenker 1995) und entlassen das freie Polyepitop.
- Das UbA76-Konstrukt macht sich die verminderte Fähigkeit der DUBs zunutze, nach der Aminosäure Alanin zu spalten (Ecker *et al.* 1989; Rock and Goldberg 1999), so daß das intakte Fusionskonstrukt an seinem Ubiquitinrest polyubiquitiniert werden kann.
- Das UbG76-R-Konstrukt bedient sich der N-End-Regel, wonach eine destabilisierende Aminosäure (hier: Arginin) am N-Terminus eines Proteins dessen proteasomalen Abbau beschleunigt (Bachmair *et al.* 1986; Gonda *et al.* 1989; Varshavsky 1992). Durch die DUB-vermittelte Abspaltung des Ubiquitins kann jede beliebige N-terminale Aminosäure generiert werden. Die durch eine destabilisierende Aminosäure favorisierte Degradation ist abhängig von der Polyubiquitinierung des Zielproteins an einem internen Lysinrest (Bachmair and Varshavsky 1989; Chau *et al.* 1989).
- Die stabile C-terminale Fusion von Ubiquitin an das Polyepitop könnte ähnlich wie im Fall des UbA76-Konstrukts die Polyubiquitinierung des Fusionskonstrukts am Ubiquitin erlauben.

Tab. 8: Aufbau der Polyepitop- (GFP-) Plasmide. Ub: Ubiquitin; G76: C-terminales Glycin; A76: C-terminales Alanin; R: destabilisierendes Arginin; DUBs: deubiquitinierende Enzyme; GFP: *green fluorescent protein*.

NAME DES PLASMIDS	ERLÄUTERUNG	REFERENZEN
1: UbG76 - 4xMUC1 <sub>950-958</sub>	Freisetzung des Polyepitops nach DUB-vermittelter Abspaltung von Ub an Position G76	Liu 2001 Xiang 2000
2: UbA76 - 4xMUC1 <sub>950-958</sub>	Mutation G76A verhindert DUB-vermittelte Ub-Abspaltung; N-terminales Ub dient als Polyubiquitinierungs-Stelle	Rodriguez 1997 Delogu 2000
3: UbG76 - R - 4xMUC1 <sub>950-958</sub>	Abspaltung von Ub durch DUBs generiert N-terminale destabilisierende Aminosäure R	Wu 1997 Tobery 1997 Delogu 2000
4: 4xMUC1 <sub>950-958</sub> - UbG76	C-terminales Ub dient als Polyubiquitinierungs-Stelle	Velders 2001
5: 4xMUC1 <sub>950-958</sub>	Polyepitop ohne Ub	An 1997 Firat 2001
<b>MUC1</b>	gesamtes MUC1-Protein	
1: UbG76 - GFP - 4xMUC1 <sub>950-958</sub>	Konstrukte wie oben, mit GFP als Reporterprotein	Tellam 2001
2: UbA76 - GFP - 4xMUC1 <sub>950-958</sub>		Tellam 2001
3: UbG76 - R - GFP - 4xMUC1 <sub>950-958</sub>		Tellam 2001
4: 4xMUC1 <sub>950-958</sub> - GFP - UbG76		Qian 2002
5: 4xMUC1 <sub>950-958</sub> - GFP		Bellanger 2001
<b>GFP</b>	gesamtes GFP-Protein	

Als Kontrollen dienten ein Polyepitop-Plasmid ohne Ubiquitin, ein Plasmid mit der gesamten MUC1-Sequenz sowie ein GFP-Plasmid. Die Verwendung des Reporterproteins GFP (*green fluorescent protein*) dient dazu, den Abbau eines Plasmid-codierten Konstrukts mittels einer FACS-Analyse zu quantifizieren (Qian *et al.* 2002). Daher wurde für diese Arbeit in alle Plasmide zusätzlich die GFP-Sequenz ligiert, und zwar zwischen die Sequenz für Ubiquitin und die für das Polyepitop (Abb.13, Tab.8).

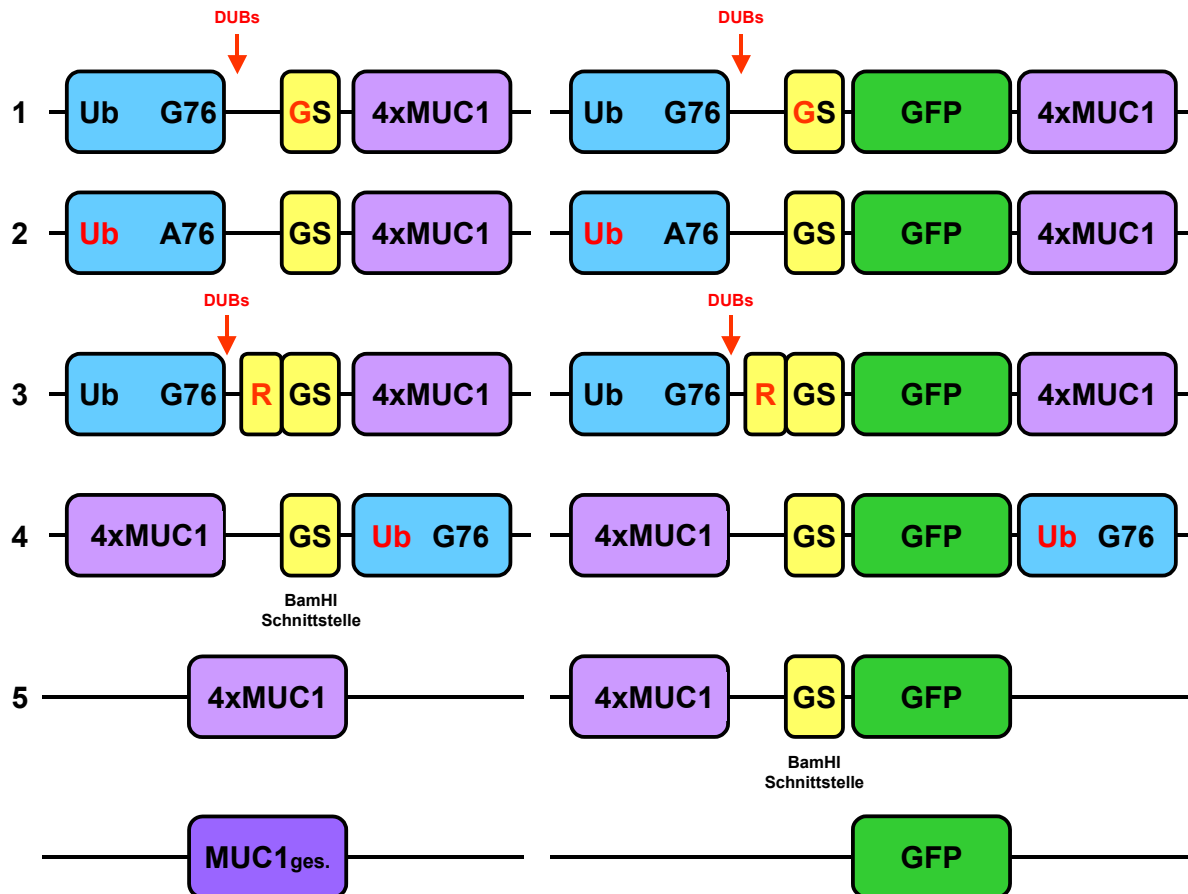


Abb. 13: Aufbau der Polyepitop- (GFP-) Plasmide 1-5 und der Kontrollplasmide. Rot dargestellt sind die zur proteasomalen Degradation relevanten Unterschiede zwischen den Konstrukten. Alle Plasmide wurden mittels Sequenzierung überprüft. Ub: Ubiquitin; G76: C-terminales Glycin; (↓) Ubiquitinabsaltung durch deubiquitinierende Enzyme; GS: Glycin-Serin, BamHI-Schnittstelle der Klonierung; 4xMUC1: MUC1<sub>950-958</sub>-Polyepitop; GFP: *green fluorescent protein*; A76: C-terminales Alanin; R: destabilisierendes Arginin; MUC1<sub>ges.</sub>: vollständiges MUC1-Protein.

### 3.2.2 Funktionsanalyse eines MUC1-spezifischen Antikörpers

Zum experimentellen Nachweis des Peptids MUC1<sub>950-958</sub> wurden von Dr. Aurelija Zvirbliene (Institute of Biotechnology, Vilnius, Litauen) zwei murine monoklonale Antikörper vom IgG1-Isotyp hergestellt. Die Immunisierung der Mäuse erfolgte mit Virus-ähnlichen Partikeln (VLPs, *virus like particles*), bestehend aus rekombinantem chimärem VP1/MUC1-Protein (*hamster polyomavirus major capsid protein* VP1 mit MUC1<sub>950-958</sub>-Inserts). In einem indirekten ELISA-Assay wurde die Reaktivität der Antikörper 12B2 und 14G2 sowohl gegen VP1/MUC1 als auch gegen das Epitop MUC1<sub>950-958</sub> allein bestätigt. Auch im Immunoblot reagierten beide Antikörper gegen das VP1/MUC1-Protein. Eine Reaktivität gegen VP1 allein hingegen wurde weder im ELISA noch im Immunoblot beobachtet, so daß sich die Antikörper als MUC1-spezifisch erwiesen.

Für die vorliegende Arbeit sollte untersucht werden, ob die Antikörper das Peptid MUC1<sub>950-958</sub> im Komplex mit HLA-A2.1 auf der Zelloberfläche erkennen. Eine indirekte Immunfluoreszenz mittels FACS-Analyse von Peptid-beladenen T2-Zellen ergab keine Reaktivität der Antikörper (Abb.14). Es ist denkbar, daß das Peptid derart in der MHC Klasse I-Bindungstasche verankert ist, daß seine Erkennung durch die Antikörper sterisch behindert ist.

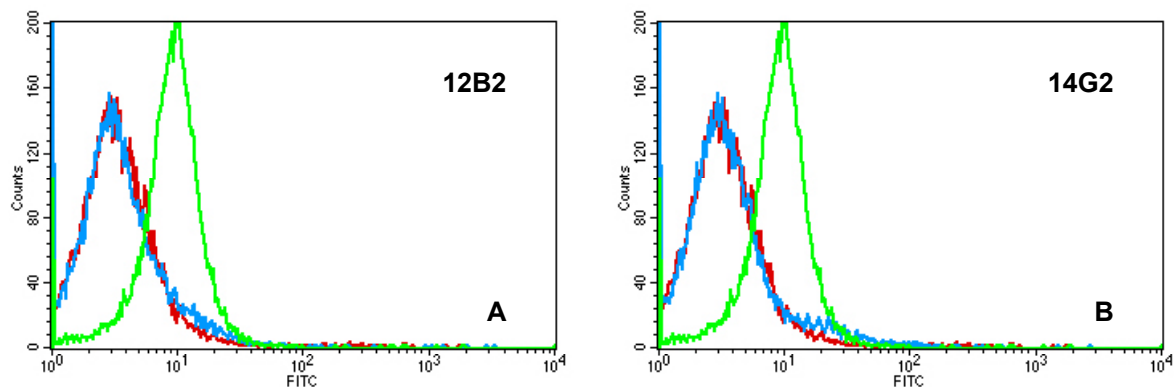


Abb. 14: FACS-Histogramm zur Untersuchung der Reaktivität der MUC1<sub>950-958</sub>-spezifischen Antikörper 12B2 (A) und 14G2 (B). T2-Zellen wurden ü.N. mit 100 µM des Peptids MUC1<sub>950-958</sub> beladen. Der Inkubation mit den primären Antikörpern folgte ein Nachweis mit einem sekundären α Maus IgG-FITC. Rot: ohne primären Antikörper (Negativkontrolle); blau: 12B2 oder 14G2; grün: α HLA-A2 (Positivkontrolle).

Des weiteren wurden beide Antikörper auf ihre spezifische Reaktivität im Immunoblot analysiert. Hierfür wurden jeweils 3 µg der Peptide MUC1<sub>950-958</sub> und 3xMUC1<sub>950-958</sub> in einer Dot Blot-Analyse eingesetzt (Abb.15). Beide Antikörper erkannten das dreifache MUC1-Epitop, während das einfache MUC1-Epitop entgegen den Erwartungen von keinem der beiden Antikörper detektiert wurde. Möglicherweise haftete das kurze Epitop nicht ausreichend stark an der Nitrocellulosemembran und wurde während der verschiedenen Inkubationen abgewaschen. Für die folgenden Untersuchungen war insbesondere der Nachweis des Polyepitops von Bedeutung. Diese Funktion erfüllten beide Antikörper gleichermaßen, und es wurde der Antikörper 14G2 für die anschließenden Analysen eingesetzt.

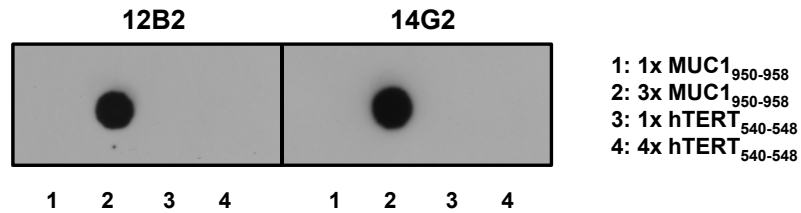


Abb. 15: Dot Blot-Analyse zur Untersuchung der Reaktivität der MUC1<sub>950-958</sub>-spezifischen Antikörper 12B2 und 14G2. Jeweils 3 µg der angegebenen Peptide wurden auf eine Nitrocellulosemembran getropft. Die Membranen wurden mit den beiden primären Antikörpern und anschließend mit einem α Maus IgG-Peroxidase Antikörper inkubiert. Der Nachweis erfolgte über eine ECL-Reaktion.

### 3.2.3 Untersuchung der zellulären Polyepitop-Degradation

Die Translationsprodukte der verschiedenen Polyepitop- (GFP-) Plasmide wurden zunächst hinsichtlich der Effizienz ihres intrazellulären Abbaus untersucht. Diese Untersuchung sollte Hinweise auf den Effekt der unterschiedlichen Ubiquitinierungen auf die Abbauraten des Polyepitops liefern. Für eine solche Analyse stehen die stabile und die transiente Transfektion der Plasmide zur Verfügung. Eine stabile Transfektion ermöglicht es jedoch nicht, Unterschiede in der Degradationsrate der Konstrukte zu analysieren. Der Grund hierfür liegt in der Selektion eines bestimmten Klons, der stets mit einer definierten Expressionsrate verbunden ist und keine Vergleiche mit der Expression bzw. Degradation anderer Transfektanten zulässt. Daher wurde für die folgenden Analysen die transiente Transfektion der Plasmide durchgeführt, die zu einer gleichmäßigen Verteilung der Expressionsraten führt. Da alle Plasmide auf demselben Vektor basieren, sich nur geringfügig in ihrer Länge und Sequenz unterscheiden und identisch aufgereinigt wurden, konnte von einer übereinstimmenden Transfektionseffizienz der Plasmide ausgegangen werden. Alle Transfektionsversuche wurden außerdem zur Verifizierung der Ergebnisse dreimal wiederholt. Als Zielzellen wurden HeLa-Zellen gewählt und die Transfektionseffizienz anhand eines GFP-Plasmids (pCI-GFP) und der Quantifizierung der GFP-Expression am Fluoreszenzmikroskop optimiert. Die Elektroporation erwies sich als geeignetste Methode, da sie zu einer reproduzierbaren Transfektionseffizienz von ca. 90% führte (Abb.16).

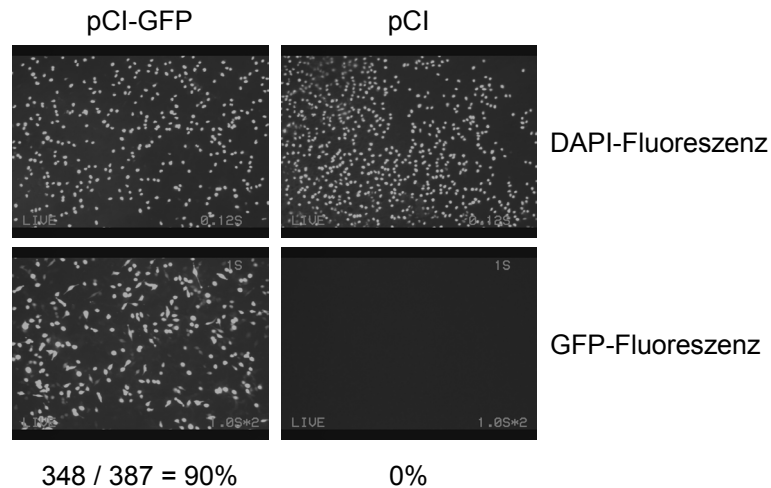


Abb. 16: Anteil GFP-transfizierter HeLa-Zellen an allen DAPI-fluoreszierenden Zellen als Maß für die Transfektionseffizienz.  $3 \times 10^6$  HeLa-Zellen wurden in 300  $\mu$ l Serum-freiem RPMI aufgenommen und mit 20  $\mu$ g des Plasmids pCI-GFP oder pCI-Mock in einer 4 mm Küvette bei 210 V und 975  $\mu$ F elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen in einer 10 cm Kulturplatte auf einem Objektträger für 36h kultiviert, PFA-fixiert, DAPI-gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Der Nachweis der Proteinstabilität bzw. -degradation erfolgte zunächst im Immunoblot. HeLa-Zellen wurden wie zuvor beschrieben mit den verschiedenen Polyepitop-Plasmiden sowohl mit als auch ohne GFP-Insert elektroporiert. Um den Einfluß des Proteasoms auf den Abbau der Polyepitope zu untersuchen, wurde ein Teil der Zellen 24h nach der Transfektion mit dem Proteasomeninhibitor MG132 behandelt. Nach weiteren 12h wurde das Zellysat mittels SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Die Intensität der MUC1<sub>950-958</sub>- und der GFP-Banden wurde über densitometrische Analysen ermittelt.

Bei den ersten vier Konstrukten ohne GFP (siehe auch Klappentext) konnte eine Anreicherung des Polyepitops unter dem Einfluß von MG132 beobachtet werden (Abb.17). Offenbar stellen die Ubiquitin-fusionierten Polyepitope ohne GFP proteasomale Substrate dar. Vergleicht man diese vier Konstrukte unter MG132-Behandlung, so erkennt man eine etwa gleiche Bandenstärke des Polyepitops in allen Fällen. Es kann daher von einer gleichen Transfektionseffizienz und Expression der verschiedenen Plasmide ausgegangen werden. Die relative Laufgeschwindigkeit der Banden entspricht einer Größe der Konstrukte von 13kDa (9kDa Ubiquitin + 4kDa 4xMUC1<sub>950-958</sub>). Dies läßt auf eine fehlende Ubiquitinabspaltung bei den Konstrukten 1 und 3 bzw. auf eine fehlende Polyubiquitinierung der Konstrukte 2 und 4 schließen. Obwohl scheinbar bei keinem der Konstrukte der erwartete Mechanismus stattgefunden hatte, konnten ohne die Zugabe von MG132 starke Unterschiede in der Stabilität der Polyepitope ausgemacht werden. So sind die beiden Konstrukte 2 und 4, bei denen das Ubiquitin N- oder C-terminal „fest“ an das Polyepitop fusioniert ist, besonders stabil. Die beiden Konstrukte 1 und 3 hingegen, bei denen eine Ubiquitinabspaltung postuliert wurde, wurden offenbar effizienter degradiert. Bei Plasmid 4 (4xMUC1<sub>950-958</sub>-Ub) fällt eine

starke Anreicherung hochmolekularer Komplexe auf, auf deren möglichen Charakter in der Diskussion näher eingegangen wird. Ebenso auffällig ist das Fehlen der Polyepitop-Bande im Lysat jener Zellen, die mit dem Plasmid 5 (4xMUC1<sub>950-958</sub>) transfiziert wurden. Es wurde daher überprüft, ob das synthetische 4kDa MUC1-Polyepitop (Pep105) mittels SDS-PAGE und Immunoblot detektiert werden konnte. Tatsächlich gelang dieser Nachweis nicht. Diese technischen Schwierigkeiten bei der Detektion kleiner Peptide im Immunoblot sind auf das Laufverhalten der Peptide im SDS-Gel oder auf ihren Durchtritt durch die Nitrocellulosemembran beim Transfer zurückzuführen. Ob also das Polyepitop ohne die Ubiquitininfusion stabil oder instabil ist, ließ sich anhand des vorliegenden Immunoblots nicht feststellen. Diese Frage könnte in späteren Untersuchungen anhand eines Cytotoxizitätsassays beantwortet werden. Auch das gesamte MUC1-Protein konnte im Zellysate nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise ist durch die starke Glykosylierung von MUC1 das Epitop für den Antikörper im Immunoblot nicht zugänglich.



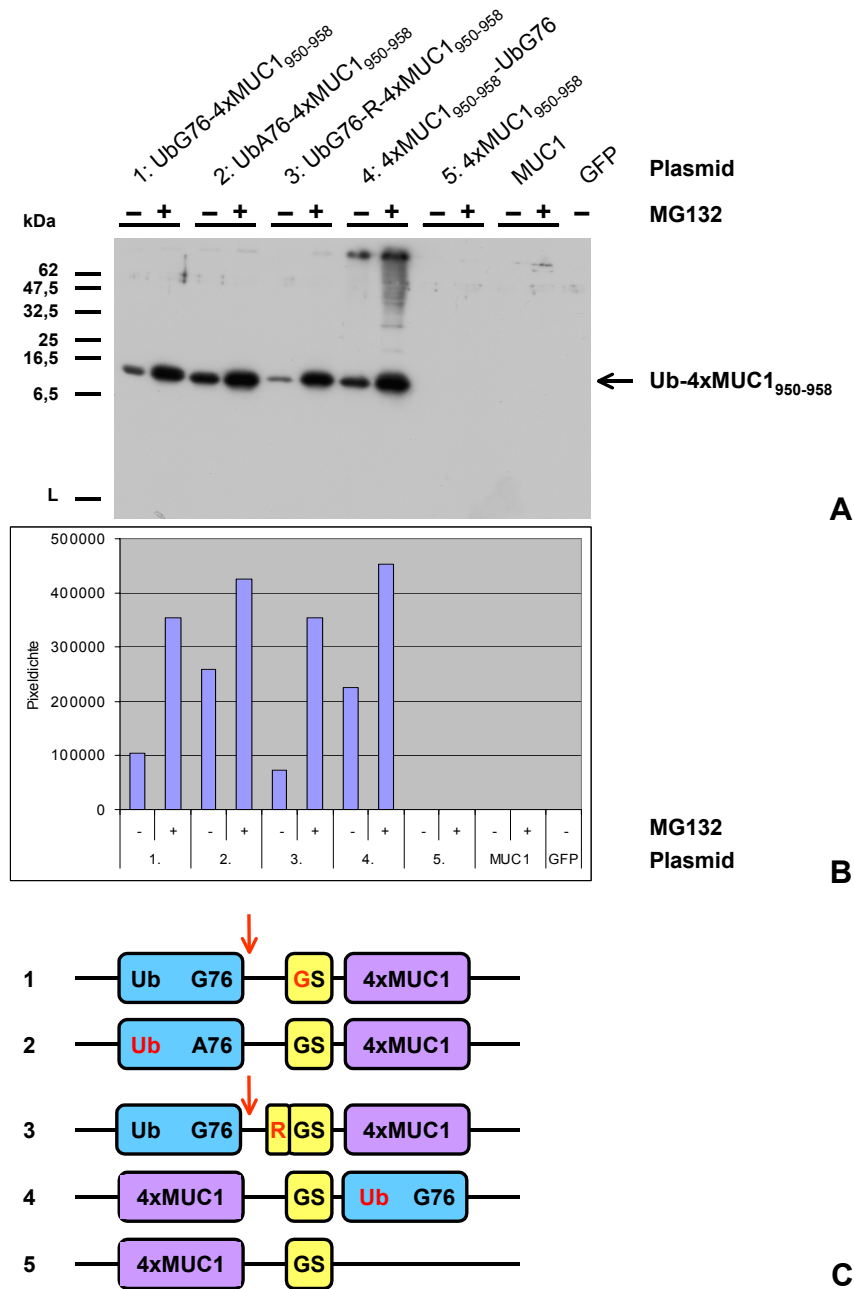


Abb. 17: Quantitativer Immunoblot von 40 µg Zellysat aus Plasmid-transfizierten HeLa-Zellen mit dem MUC1<sub>950-958</sub>-spezifischen Antikörper 14G2. (A) 24h nach transients Transfektion wurde ein Teil der Zellen mit 10µM MG132 behandelt. Nach weiteren 12h wurden die Zellen geerntet, lysiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einem Immunoblot unterzogen. L: Lauffront. (B) Densitometrische Auswertung der Bandenstärken. (C) Aufbau der Polyepitop-Plasmide 1-5. Ub: Ubiquitin; G76: C-terminales Glycin; (↓) Ubiquitinabspaltung durch deubiquitinierende Enzyme; GS: Glycin-Serin, BamHI-Schnittstelle der Klonierung; 4xMUC1: MUC1<sub>950-958</sub>-Polyepitop; A76: C-terminales Alanin; R: destabilisierendes Arginin.

Wurde dasselbe Experiment mit den Plasmiden durchgeführt, die sich zusätzlich durch die GFP-Sequenz auszeichnen, ergab sich ein verändertes Bild (Abb.18). Zunächst konnte unter MG132-Einfluß keine generelle Anreicherung der Konstrukte beobachtet werden. Nur die Konstrukte 1 und 3 erwiesen sich durch ihre starke Akkumulation unter MG132 als instabile

proteasomale Substrate, während sich die anderen Konstrukte -möglicherweise aufgrund des Reporterproteins GFP- durch eine hohe Stabilität auszeichneten. Konstrukt 5 (4xMUC1<sub>950-958</sub>-GFP) war besonders stabil und wurde nicht proteasomal degradiert, was auf eine generell destabilisierende Wirkung der Ubiquitininfusion bei den anderen Konstrukten schließen läßt. Konstrukt 4 (4xMUC1<sub>950-958</sub>-GFP-Ub) wies eine leichte Verminderung der Bandenstärke unter MG132-Behandlung auf, eine reproduzierbare Beobachtung, die mit einer leichten Zunahme der bereits zuvor erwähnten hochmolekularen Komplexe einherging. Auf das ungewöhnliche Verhalten dieses Konstrukts soll später eingegangen werden. Alle übrigen Konstrukte wiesen unter MG132-Behandlung die gleiche Bandenstärke auf, mit Ausnahme von Konstrukt 1. Möglicherweise wurde durch einen Fehler bei der Aufreinigung oder Lagerung die Qualität von Plasmid 1 beeinträchtigt, ein Umstand, der die Transfektionseffizienz vermindern kann.

Im Gegensatz zu den Konstrukten ohne GFP wurde bei den Konstrukten mit GFP das N-terminale Ubiquitin stets abgespalten. Die relative Laufgeschwindigkeit der Banden entspricht einer Größe der Konstrukte von 32kDa (28kDa GFP + 4kDa 4xMUC1<sub>950-958</sub>). Entgegen der Prognose der N-End-Regel war Konstrukt 3 mit N-terminalem Arginin stabiler als Konstrukt 1 mit Glycin am N-Terminus: Unabhängig von eventuell verschiedenen Transfektionseffizienzen oder Expressionsstärken beider Plasmide weist Konstrukt 1 eine wesentlich stärkere Anreicherung unter MG132 auf als Konstrukt 3. Während die Ubiquitin-Abspaltung bei den Konstrukten 1 und 3 zu erwarten war, erfolgte sie auch im Konstrukt 2 trotz der Aminosäure Alanin an Position 76 des Ubiquitins fast vollständig. Alanin kann also die Aktivität deubiquitinierender Enzyme in der Zelle nicht unterbinden, sondern nur leicht beeinträchtigen. Ob die Abspaltung hinter der Position G75 oder A76 stattgefunden hat, ist nicht geklärt. Die beiden Fälle führen zu unterschiedlichen N-terminalen Resten des Fusionskonstrukts -Alanin oder Glycin- und können somit einen unterschiedlichen Einfluß auf dessen Stabilität ausüben. Das deubiquitinierte Konstrukt 2 mit GFP verhielt sich ähnlich stabil wie das nicht deubiquitinierte Konstrukt 2 ohne GFP.

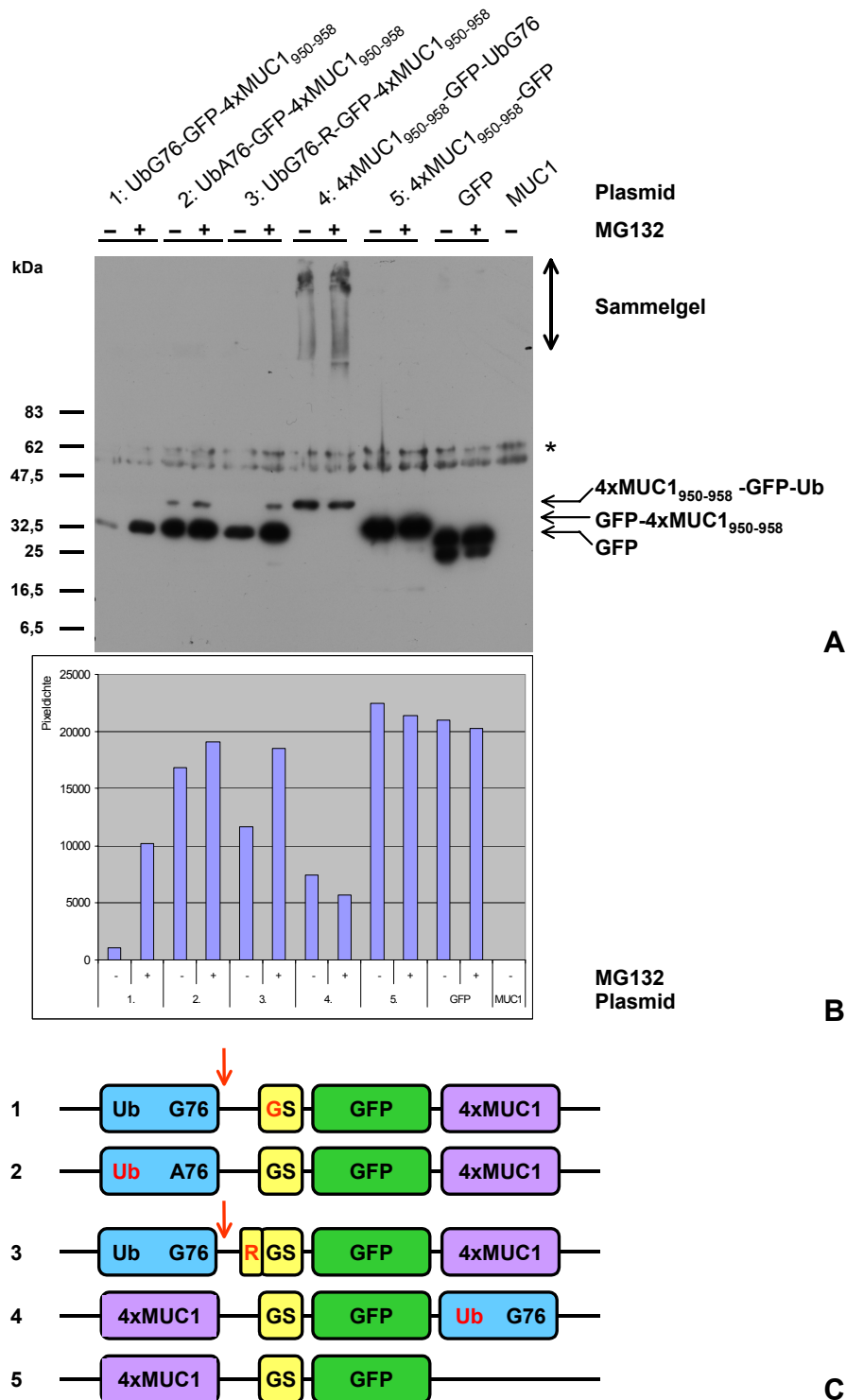


Abb. 18: Quantitativer Immunoblot von 40 µg Zellysats aus Plasmid-transfizierten HeLa-Zellen mit einem GFP-spezifischen Antikörper. (A) 24h nach transients Transfektion wurde ein Teil der Zellen mit 10µM MG132 behandelt. Nach weiteren 12h wurden die Zellen geerntet, lysiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einem Immunoblot unterzogen. Das untere Signal der GFP-Doppelbande wird häufig beobachtet und stellt wahrscheinlich ein Abbauprodukt dar. \* Beschriebene Kreuzreaktion des GFP-Antikörpers mit HeLa-Zellysats. (B) Densitometrische Auswertung der Bandenstärken. (C) Aufbau der Polyepitop-GFP-Plasmide 1-5. Ub: Ubiquitin; G76: C-terminales Glycin; (↓) Ubiquitinabspaltung durch deubiquitinierende Enzyme; GS: Glycin-Serin, BamHI-Schnittstelle der Klonierung; 4xMUC1: MUC1<sub>950-958</sub>-Polyepitop; GFP: *green fluorescent protein*; A76: C-terminales Alanin; R: destabilisierendes Arginin.

Eine weitere Untersuchung sollte der genaueren Quantifizierung des GFP-Gehalts in den Plasmid-transfizierten und MG132-behandelten Zellen dienen. Hierfür wurde ein Teil der wie zuvor beschrieben transfizierten Zellen nicht lysiert, sondern für eine direkte FACS-Analyse verwendet. Zwei Parameter beeinträchtigten die Auswertung dieser Messungen: Erstens zeichnet sich die transiente Transfektion durch eine sehr heterogene Expressionsstärke des transfizierten Proteins in den einzelnen Zellen aus. In der Histogrammdarstellung ergab sich somit eine eher gleichmäßige Verteilung der relativen GFP-Fluoreszenzintensität über die gesamte Meßspanne von  $10^0$  bis  $10^4$ . Zweitens ging bei gegebenen Spannungs- und Verstärkereinstellungen die relative GFP-Fluoreszenzintensität über den höchsten Meßwert von  $10^4$  hinaus. Dadurch konnte der maximale Bereich der GFP-Fluoreszenz nicht erfaßt werden. Um trotzdem einen quantitativen Unterschied zwischen den einzelnen Konstrukten erfassen zu können, wurde der Anteil der Zellen ermittelt, deren GFP-Expression im Meßbereich von  $10^3$  bis  $10^4$  lag (Abb.19).

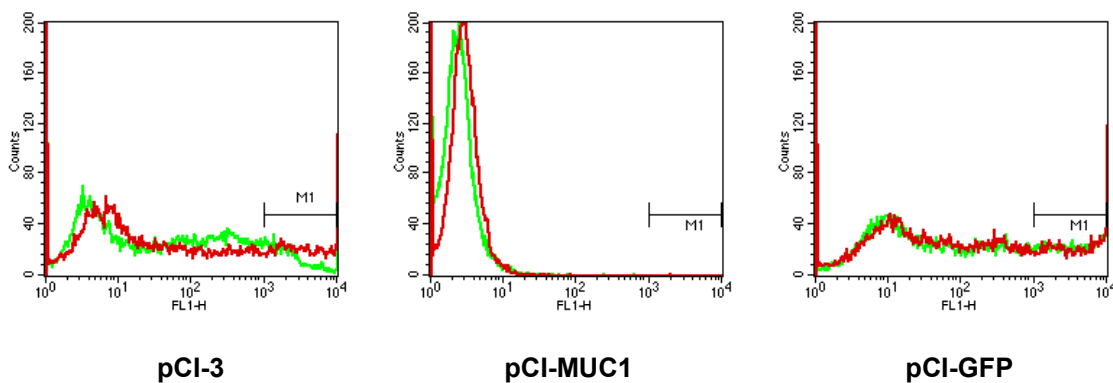


Abb. 19: FACS-Histogramme zur GFP-Expression der transient transfizierten HeLa-Zellen am Beispiel der Plasmide pCI-3, -MUC1 und -GFP. Der Marker M1 stellt den zur Auswertung herangezogenen Meßbereich von  $10^3$ - $10^4$  dar. Grün: - MG132; rot: + MG132.

Die Daten aus den FACS-Analysen (Abb.20) bestätigten weitgehend die Ergebnisse, die bereits im Immunoblot erzielt wurden: Eine klare Anreicherung von GFP unter dem Einfluß von MG132 konnte hauptsächlich bei den Konstrukten 1 und 3 beobachtet werden. Konstrukt 2 (UbA76-GFP-4xMUC1<sub>950-958</sub>) scheint hingegen kein proteasomales Substrat zu sein. Ohne Ubiquitin wurde die größte Stabilität erzielt: Konstrukt 5 (4xMUC1<sub>950-958</sub>-GFP) führte zu einer ebenso starken GFP-Fluoreszenz wie das GFP-Plasmid und wies außerdem keine Anreicherung unter MG132 auf.

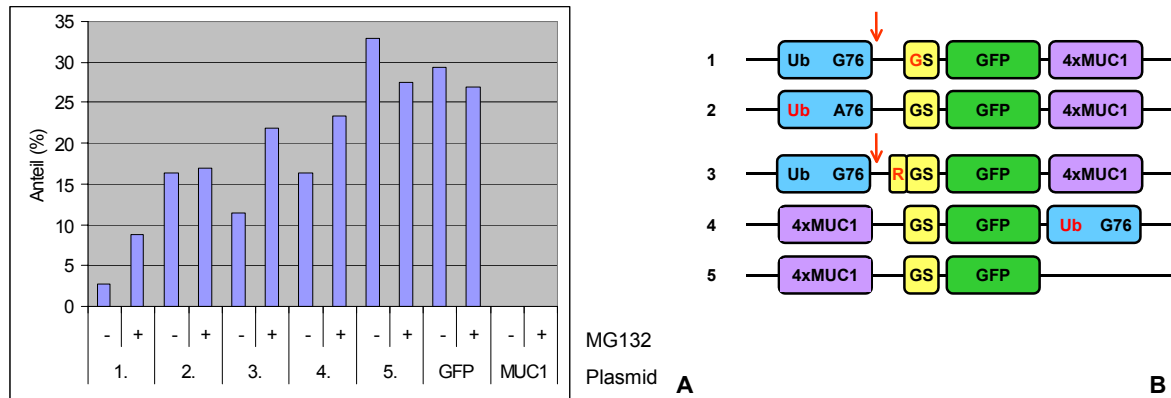


Abb. 20: Anteil der in der FACS-Analyse im Meßbereich von  $10^3$ - $10^4$  GFP-fluoreszierenden HeLa-Zellen an allen Plasmid-transfizierten Zellen (in Prozent). (A) 24h nach transients Transfektion wurde ein Teil der Zellen mit  $10\mu\text{M}$  MG132 behandelt. Nach weiteren 12h erfolgte die Messung der GFP-Fluoreszenz am Durchflußzytometer. (B) Aufbau der Polyepitop-GFP-Plasmide 1-5.

Ein Vergleich der Konstrukte ohne GFP einerseits mit den Konstrukten mit GFP andererseits ist zusammenfassend in Tabelle 9 dargestellt. Es läßt sich insbesondere feststellen, daß die Konstrukte ohne GFP keiner Deubiquitinierung unterlagen, während die GFP-Fusion die Abspaltung des N-terminalen Ubiquitins mit sich brachte. Ungeachtet dieses Unterschieds erwiesen sich stets die Konstrukte 1 und 3 als die instabilsten. Eine weitere Gemeinsamkeit bestand in der erhöhten Stabilität der Konstrukte mit Alanin am C-Terminus des Ubiquitins sowie in der Anreicherung hochmolekularer Komplexe bei C-terminaler Ubiquitininfusion. Die Daten der Immunoblot- und FACS-Analysen demonstrieren, daß das Reporterprotein GFP einen starken Einfluß auf die Ubiquitinabspaltung und die Stabilität der verschiedenen Polyepitop-Konstrukte ausübt. Der stabilisierende Effekt von GFP auf die Polyepitope war im Rahmen dieser Vakzinierungs-Untersuchung unerwünscht. Da die anschließenden Analysen außerdem das Reporterprotein als Readout nicht mehr erforderten, wurden im Folgenden nur die Plasmide ohne GFP verwendet.

Tab. 9: Vergleich der Polyepitop-Konstrukte 1-5 ohne und mit GFP-Sequenz. Zusammenfassung der Ergebnisse von Immunoblot- und FACS-Analysen.

	ERWARTUNG	OHNE GFP	MIT GFP
<b>ANREICHERUNG UNTER MG132</b>	1-5	1-4	1, 3
<b>GLEICHE EXPRESSIONSSTÄRKE UNTER MG132</b>	1-5	1-4	(1), 2, 3, 5
<b>ABSPALTUNG DES N-TERMINALEN UBIQUITINS</b>	1, 3	-/-	1, 2, 3
<b>POLYUBIQUITINIERUNG</b>	2, 4	-/- (4?)	-/- (4?)
<b>INSTABILSTES KONSTRUKT</b>	?	1, 3	(1?), 3
<b>STABILSTES KONSTRUKT</b>	?	2, 4	5

### 3.3 MHC KLASSE I-RESTRINGIERTE PRÄSENTATION DES MUC1-EPITOPS

Die Untersuchung Plasmid-transfizierter Zellen mittels eines Cytotoxizitätsassays sollte der Frage nachgehen, ob die verstärkte Prozessierung eines Polyepitops auch zu einer stärkeren MHC Klasse I-Präsentation der Einzelpeptide und deren Erkennung durch CTLs führt. Dieser Nachweis ist von immunologischer Relevanz, da nur eine effiziente Epitopräsentation eine starke CTL-Antwort *in vivo* auslösen kann.

#### 3.3.1 Generierung von Zielzellen für einen Cytotoxizitäts-Assay

Als Zielzellen für den Cytotoxizitätsassay wurden NIH-3T3-Zellen, murine embryonale Fibroblasten, gewählt. Diese entstammen demselben immunologischen Hintergrund wie HHD-Mäuse (C57Black/6). Sie verfügen über ein intaktes TAP-System und können daher cytosolisch prozessierte Epitope MHC Klasse I-abhängig präsentieren. Die NIH-3T3-Zellen wurden zunächst mit dem Plasmid für das HHD-Molekül stabil transfiziert (NIH-3T3-HHD) (Abb.21), um ihre Erkennung durch CTLs aus HHD-transgenen Mäusen zu gewährleisten.

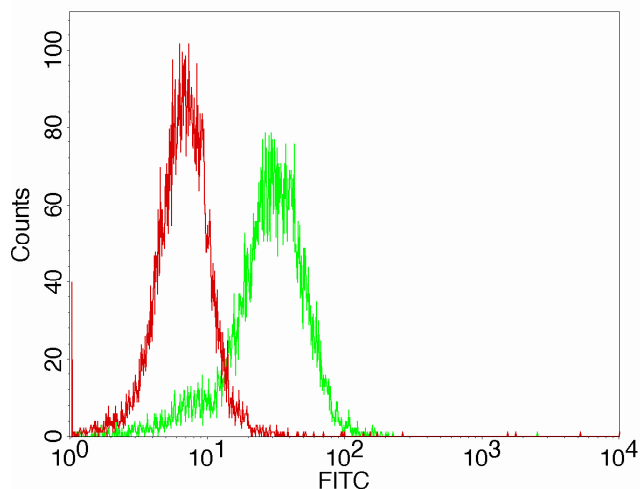


Abb. 21: FACS-Analyse der Expression des HHD-Moleküls in stabil transfizierten murinen NIH-3T3-Zellen (NIH-3T3-HHD). Antikörper:  $\alpha$  HLA-A,B,C-FITC (grün), IgG-Isotypenkontrolle-FITC (rot).

Wie in Abschnitt 3.2.3 für die HeLa-Zellen beschrieben, wurde die Effizienz der transienten Transfektion der NIH-3T3-HHD-Zellen anhand des Plasmids pCI-GFP und der Quantifizierung der GFP-Expression am Fluoreszenzmikroskop optimiert. Auch hier erwies sich die Elektroporation als geeignetste Methode zur starken Expression des transfizierten Plasmids (Abb.22).

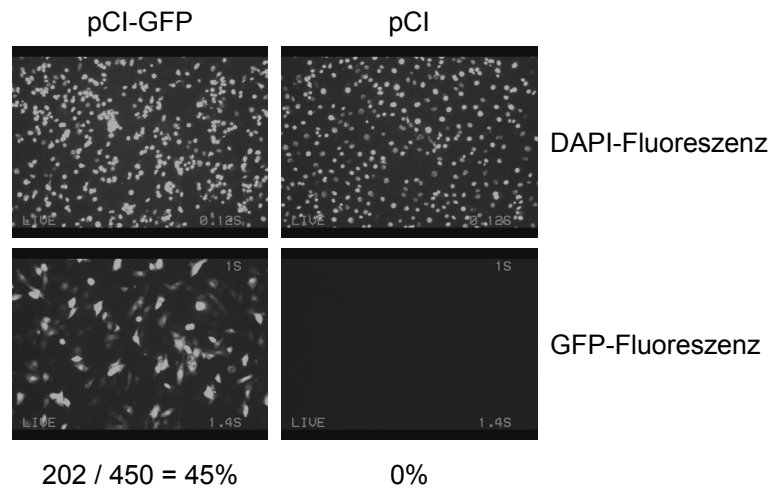


Abb. 22: Anteil GFP-transfizierter NIH-3T3-HHD-Zellen an allen DAPI-fluoreszierenden Zellen als Maß für die Transfektionseffizienz. Zellen einer konfluenten 15 cm Kulturplatte wurden in 300  $\mu$ l Serum-freiem RPMI aufgenommen und mit 40  $\mu$ g des Plasmids pCI-GFP oder pCI-Mock in einer 4 mm Küvette bei 220 V und 975  $\mu$ F elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen in einer 10 cm Kulturplatte auf einem Objektträger für 36h kultiviert, PFA-fixiert, DAPI-gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Die NIH-3T3-HHD-Zellen sollten 36h nach transients Transfektion der verschiedenen Polyepitop-Plasmide mit  $^{51}\text{Cr}$  markiert und in einen Cytotoxizitätsassay eingesetzt werden. Ebenso wie für die zuvor beschriebenen Transfektionen sollte die Behandlung der Zellen mit MG132 klären, ob eine Epitopräsentation durch Inhibition des Proteasoms unterbunden werden kann.

### 3.3.2 Generierung eines MUC1-spezifischen CTL-Klons aus HHD-Mäusen

Zur Analyse der Plasmide anhand eines Cytotoxizitätsassays wurden MUC1<sub>950-958</sub>-spezifische CTLs aus HHD-transgenen Mäusen benötigt. Diese CTLs gewinnt man in der Regel durch Immunisierung von HHD-Mäusen entweder mit synthetischen Peptiden oder mit einem Epitop-codierenden Plasmid. Während die Immunisierung mit einem MHC Klasse I-restringierten synthetischen Peptid allein in einigen Fällen zur Generierung von CTL-Antworten ausreicht (Vasilakos and Michael 1993), ist in anderen Fällen die Co-Injektion eines MHC Klasse II-abhängigen Helferpeptids zur Verbesserung oder Induktion der CTL-Antwort nötig (Ossendorp *et al.* 1998). Firat *et al.* konnten zeigen, daß in 17 von 19 Fällen der Zusatz eines MHC II-restringierten Helferpeptids zu einem Tumorepitop bei der Vakzinierung die CTL-Antwort induzierte oder verbesserte (Firat *et al.* 1999). Auch die Substitution der Aminosäure in Position P1 des Epitops durch Tyrosin (P1Y) kann zu einer Verbesserung der CTL-Induktion beitragen, ohne dabei die antigene Spezifität zu verändern (Tourdot *et al.* 2000). In anderen Fällen wurde eine CTL-Aktivierung nur durch Plasmid-Immunisierung erreicht, zum Beispiel durch das pCMV-B10-Plasmid, in welchem die

Epitopsequenz N-terminal an die HIV-1 V3env-Domäne ligiert wird (Firat *et al.* 1999; Le Borgne *et al.* 1998). Für die vorliegende Arbeit wurde daher die Sequenz für MUC1<sub>950-958</sub> in das Plasmid pCMV-B10 kloniert. Die Generierung MUC1<sub>950-958</sub>-spezifischer CTLs erfolgte in der Arbeitsgruppe von Dr. François Lemonnier am Institut Pasteur in Paris. Es wurden vier Gruppen mit jeweils drei HHD-Mäusen nach verschiedenen Protokollen immunisiert, um eine möglichst große Bandbreite an Strategien zur Gewinnung spezifischer CTLs auszunutzen (Tab.10).

Tab. 10: Immunisierungsprotokolle zur Generierung MUC1<sub>950-958</sub>-spezifischer CTLs in HHD-Mäusen. Das Plasmid pCMV-B10-MUC1<sub>950-958</sub> wurde in PBS gelöst und intramuskulär zu je 50 µg in jeden Oberschenkel injiziert. Die Peptide wurden zu je 100 µg mit 140 µg T-Helferpeptid (I-A<sup>b</sup>-restringiertes HBVcore<sub>128-140</sub>) in Incomplete Freund's Adjuvant subcutan an der Schwanzbasis injiziert. d0 gilt als der Tag der Milzentnahme.

GRUPPE	1. IMMUNISIERUNG		2. IMMUNISIERUNG		<i>in vitro</i> RESTIMULATION
	Agens	Tag	Agens	Tag	
<b>1</b>	pCMV-B10-MUC1 <sub>950-958</sub>	d -18	Peptid MUC1 <sub>950-958</sub>	d -11	Peptid MUC1 <sub>950-958</sub>
<b>2</b>	pCMV-B10-MUC1 <sub>950-958</sub>	d -18	Peptid MUC1 <sub>950-958</sub> -P1Y	d -11	Peptid MUC1 <sub>950-958</sub> -P1Y
<b>3</b>	Peptid MUC1 <sub>950-958</sub>	d -11	-/-	-/-	Peptid MUC1 <sub>950-958</sub>
<b>4</b>	Peptid MUC1 <sub>950-958</sub> -P1Y	d -11	-/-	-/-	Peptid MUC1 <sub>950-958</sub> -P1Y

Nach Entnahme der Milz wurden die Milzzellen für sechs Tage mit dem angegebenen Peptid restimuliert. Die weitere *in vitro* Restimulation der CTL-Kulturen erfolgte wöchentlich mit frisch isolierten, Gamma-bestrahlten, Peptid-beladenen Milzzellen aus HHD-Mäusen sowie TCGF (*T cell growth factor*). TCGF ist eine aus dem Überstand von Ratten-Milzzellkulturen unter Concavalin A-Stimulation gewonnene Mischung aus Wachstumsfaktoren, die insbesondere Interleukin-2 (IL-2) zur CTL-Stimulation enthält.

Zu verschiedenen Zeitpunkten der *in vitro* Restimulation wurden Cytotoxizitätsassays durchgeführt, die Aufschluß über die lytische Aktivität und Spezifität der kultivierten CTLs geben sollten. Als Zielzellen dienten TAP-defiziente RMA-S-Zellen, die mit dem HHD-Molekül stabil transfiziert waren (RMA-S-HHD, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von F.Lemonnier). RMA-S-Zellen eignen sich besonders als Zielzellen, da sie aufgrund ihres fehlenden funktionellen TAP-Systems weniger zelleigene Peptide auf ihrer Oberfläche präsentieren. Das exogene Beladen dieser Zellen mit dem zu untersuchenden Peptid führt daher zu einer hohen MHC Klasse I-Präsentationsdichte. Gleichzeitig gewährt die stabile Expression des HHD-Moleküls die Erkennung der RMA-S-Zellen durch CTLs aus HHD-Mäusen. Die Zielzellen wurden für die vorliegenden Untersuchungen mit dem Peptid MUC1<sub>950-958</sub>, mit MUC1<sub>950-958</sub>-P1Y oder mit dem stabilisierenden Negativkontroll-Peptid HIV1-Pol<sub>464-472</sub> (Firat *et al.* 2001) beladen, mit <sup>51</sup>Cr markiert und anschließend einem 4h Cytotoxizitätsassay unterzogen.



Aus den HHD-Mausgruppen 1 und 4 (Tab.10) konnten die CTL-Linien 1.3 und 4.3 etabliert werden, die durch hohe Cytotoxizität und Spezifität charakterisiert waren (Abb.23A,B). Beide Linien erkannten sowohl das normale Epitop MUC1<sub>950-958</sub> als auch seine P1Y-Variante. Auch die Erkennung der NIH-3T3-HHD-Zellen durch die MUC1<sub>950-958</sub>-spezifischen CTL-Linien war gewährleistet. Abbildungen 23 C und D zeigen, daß sie sich ebenso wie RMA-S-HHD als Zielzellen eigneten, wenngleich ihre Erkennung etwas schwächer ausfiel. Diese Beobachtung ist auf die größere Menge zelleigener präsentierter Peptide zurückzuführen. Aus den beiden CTL-Linien 1.3 und 4.3 wurden einige Zellen einer Klonierung unterzogen. CTL-Klone zeichnen sich im Vergleich zu Linien durch eine höhere Stabilität aus. Der gewonnene MUC1<sub>950-958</sub>-spezifische CTL-Klon 4.3c1 (Abb.23E) sollte im Folgenden für die Untersuchung der verschiedenen Polyepitop-Plasmide verwendet werden. Anhand dieses Klons wurde besonders deutlich, daß die P1Y-Peptidvariante besser als das Wildtypepitop von CTLs erkannt wurde.

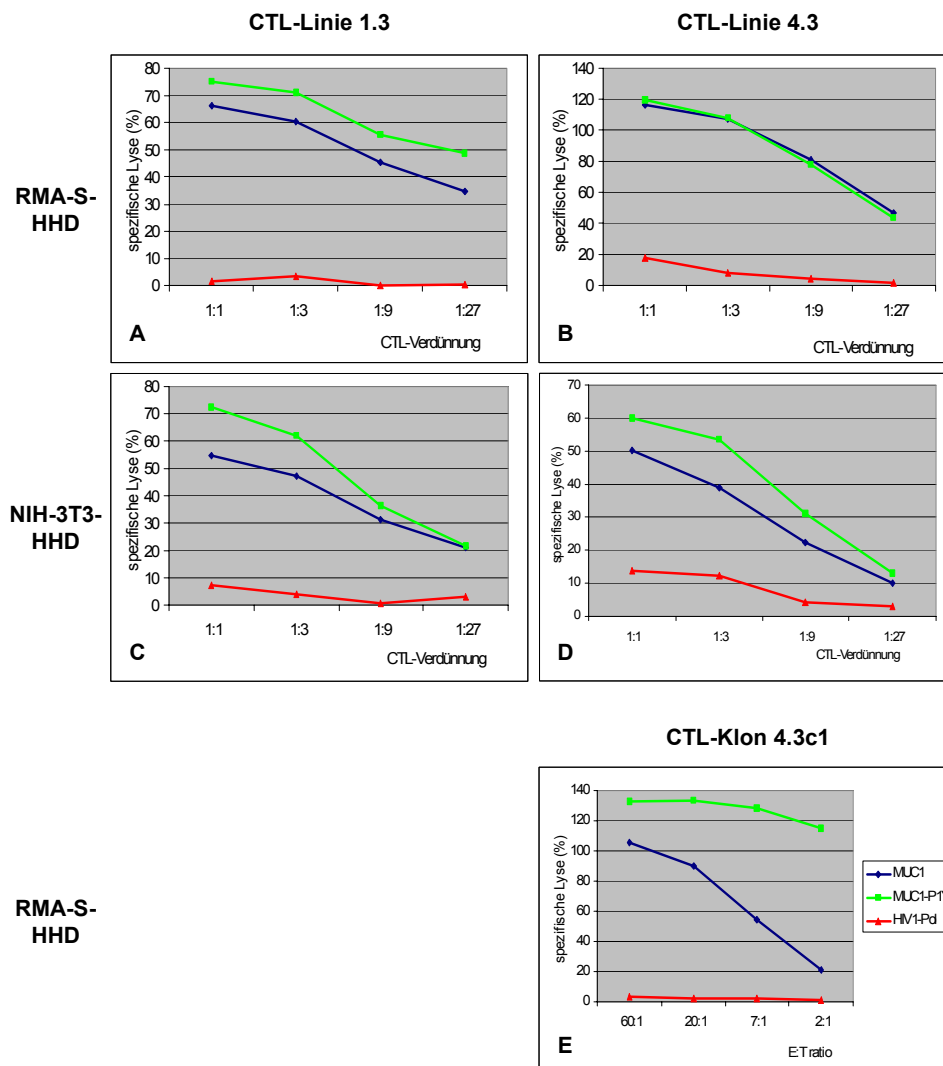


Abb. 23: Cytotoxizitätsassays zum Test der CTL-Linien 1.3 und 4.3 aus den Mausgruppen 1 und 4 (vgl. Tab.10) und des CTL-Klons 4.3c1. Die spezifische cytotoxische Aktivität wurde in einem

Standard 4h <sup>51</sup>chromium release assay getestet. Die prozentuale spezifische Lyse wurde folgendermaßen ermittelt: (spezifische Lyse – spontane Lyse) / (maximale Lyse – spontane Lyse). Als Zielzellen dienten RMA-S-HHD (A, B, E) und NIH-3T3-HHD (C, D). Peptide: MUC1<sub>950-958</sub> (blau), MUC1<sub>950-958</sub>-P1Y (grün), HIV1-Pol<sub>464-472</sub> (Negativkontrolle, rot).

Wie bereits erwähnt, erfolgte die Gewinnung MUC1<sub>950-958</sub>-spezifischer CTLs aus HHD-Mäusen in Kooperation mit einer französischen Arbeitsgruppe. Diese Gruppe hat das transgene Mausmodell HHD entwickelt, das im Vergleich zu klassischen HLA-transgenen Mäusen weniger HLA-A2.1-Moleküle auf der Zelloberfläche exprimiert und daher eine geringere Gesamtzahl an CD8<sup>+</sup> T-Zellen ausbildet (Firat *et al.* 1999). Dieser Umstand erfordert besondere Vorsichtsmaßnahmen in der Kultur und Expansion cytotoxischer T-Lymphozyten. Die Belastungen des Transports, die Vorgänge beim Einfrieren und Auftauen der Zellen sowie die veränderten Kulturbedingungen führten dazu, daß die am Institut Pasteur in Paris generierten CTLs ihre spezifische Cytotoxizität im hiesigen Labor einbüßten. Es sollte der Frage nachgegangen werden, ob möglicherweise auch eine schwache Bindung des Epitops MUC1<sub>950-958</sub> an HLA-A2.1 für diesen Effekt verantwortlich war.

### 3.3.3 MHC-Bindung und -Stabilisierung der Tumorepitope

Die Bindungs- und Stabilisierungskapazität MHC Klasse I-abhängiger Peptide reflektiert in vielen Fällen ihre Immunogenität (Kubo *et al.* 1994; Sette *et al.* 1994; van der Burg *et al.* 1996). Daher wurde die Interaktionsstärke zwischen den verschiedenen Tumorepitopen (Sequenzen vgl. Klappentext) und dem HLA-A2.1-Molekül in einem Bindungs- und Stabilisierungsassay (Firat *et al.* 1999) untersucht. Als zelluläres System dienten humane TAP-defiziente HLA-A2.1<sup>+</sup> T2-Zellen. Das exogene Beladen der Zellen mit HLA-A2.1-bindenden Peptiden führt zu einer Stabilisierung der HLA-A2.1-Moleküle, welche sich mittels indirekter Immunfluoreszenz in einer FACS-Analyse quantifizieren läßt (Abb.24).

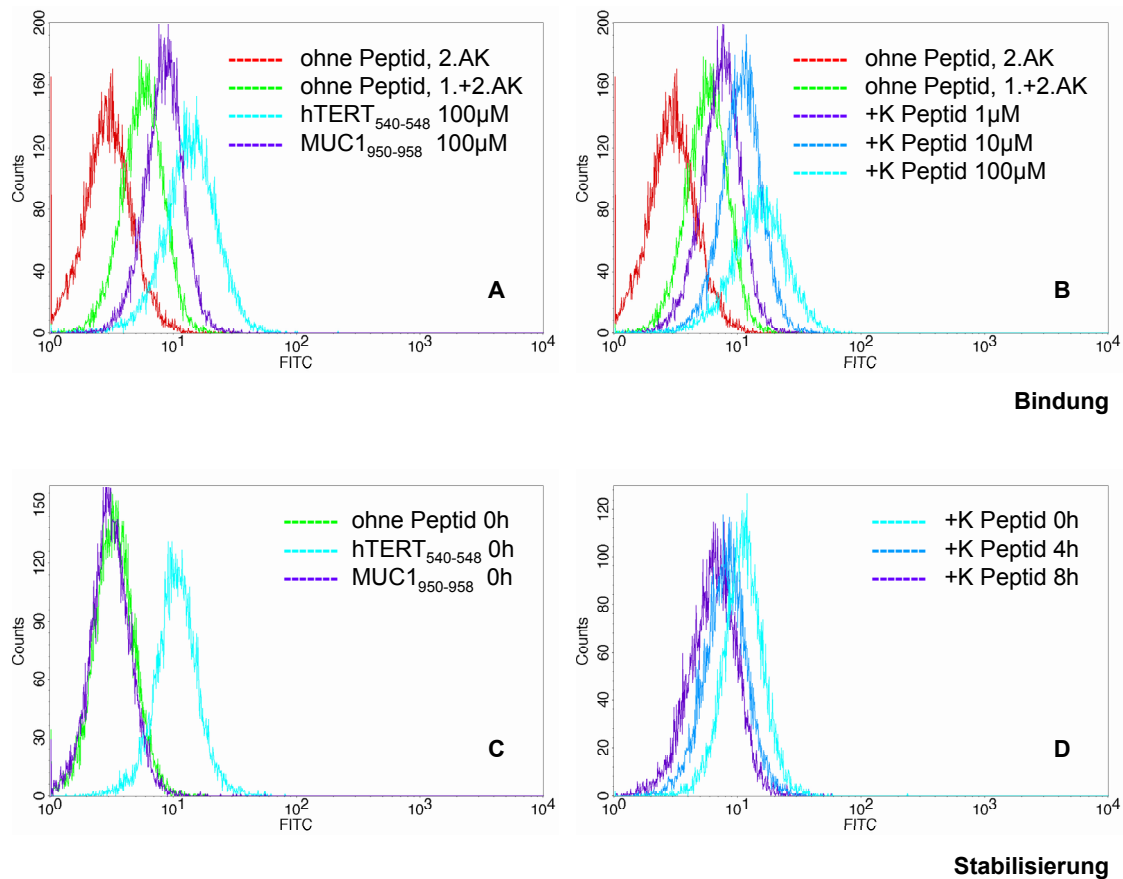


Abb. 24: FACS-Histogramme zur MHC-Peptid-Bindung (A, B) und -Stabilisierung (C, D). Die Ermittlung der Affinität erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenz und Analyse am FACScan Durchflußzytometer. Primärer Antikörper: Maus  $\alpha$  HLA-A2; sekundärer Antikörper:  $\alpha$  Maus IgG-FITC. (A, B) T2-Zellen wurden ü.N. bei 37°C mit den Peptiden in einer Konzentrationsreihe von 0,5-100 μM inkubiert. (A) Die untersuchten Peptide hTERT<sub>540-548</sub> und MUC1<sub>950-958</sub> in einer Konzentration von 100 μM. (B) Positivkontroll-Peptid Pep18 (GILGFVFTL, Influenza Matrix Protein<sub>58-66</sub>) in zunehmender Konzentrationsreihe. (C, D) T2-Zellen wurden ü.N. bei 37°C mit den Peptiden in einer Konzentration von 100 μM inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen für 0, 2, 4, 6 und 8h mit Brefeldin A zum Blockieren des endogenen MHC Klasse I-Peptidtransports inkubiert. (C) Die untersuchten Peptide hTERT<sub>540-548</sub> und MUC1<sub>950-958</sub> nach 0h Inkubation mit Brefeldin A. (D) Positivkontroll-Peptid Pep18 im zunehmenden Zeitverlauf.

Die Zellen wurden über Nacht mit den Peptiden in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Die relative Affinität (RA) als Ausdruck der Bindungsstärke eines jeden Peptids wurde in Referenz zu dem bekannten, stark bindenden Peptid Influenza Matrix Protein<sub>58-66</sub> (GILGFVFTL) ermittelt. Die Stabilität der jeweiligen Peptid-HLA-A2.1-Komplexe wurde als Ausdruck der Halbwertszeit (DC<sub>50</sub>, *dissociation complex 50*) gemessen (Tab.11). Die Ergebnisse demonstrieren, daß hTERT<sub>540-548</sub> eine starke Bindung an HLA-A2.1 bei gleichzeitig hoher Stabilität des Komplexes aufweist (RA<10 und DC<sub>50</sub>>2h). Das Epitop enthält drei Reste, welche die HLA-A2.1-Bindung begünstigen: Leucin an Position P2 stellt einen Ankerrest dar, Leucin an P9 einen sekundären Ankerrest sowie Lysin an P4 eine Bindungspräferenz (Rammensee *et al.* 1995). hTERT<sub>540-548</sub> kann somit als hochaffin bezeichnet werden. Während das WT1-Epitop eine mittlere Affinität aufweist, sind die beiden

MUC1-Epitope mit  $RA > 10$  und  $DC_{50} < 2h$  niedrigaffin, obwohl sie an Position P9 den Ankerrest Valin besitzen. Die A→V Substitution in Position P6 erhöht erwartungsgemäß die relative Affinität des Epitops MUC1<sub>950-958</sub> im Vergleich zu MUC1<sub>9-17</sub>, da Valin in Position P6 als sekundärer Ankerrest beschrieben ist (Rammensee *et al.* 1995).

Tab. 11: HLA-A2.1 Bindungs- und Stabilisierungskapazität der untersuchten Tumorepitope. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MIF) für jede Peptidkonzentration -nach Abzug der MIF ohne Peptid- wurde als Maß für die MHC-Peptid-Bindung ermittelt. Die relative Affinität (RA) stellt das Konzentrationsverhältnis des Testpeptids zum Positiv-Referenzpeptid bei Erreichen von 20% maximaler Bindung dar. Die maximale Bindung wird durch die höchste Konzentration des Referenzpeptids definiert. Die mittlere RA wurde für jedes Peptid in drei unabhängigen Experimenten ermittelt. In allen Experimenten wurde 20% der maximalen Bindung bei einer Konzentration des Referenzpeptids von 1-3µM erzielt. Je geringer die RA, desto stärker ist die Bindung. – Die Halbwertszeit der HLA-A2.1-Peptid-Komplexe ( $DC_{50}$ ) wurde durch Messung der auf der Zelloberfläche verbleibenden Komplexe im Zeitverlauf von 0, 2, 4, 6 und 8h ermittelt.  $DC_{50}$  ist die Zeit, die zum Erreichen einer 50%igen Reduktion des  $t=0h$  MIF benötigt wird. Je größer  $DC_{50}$ , desto stärker ist die Stabilisierung. Hohe Affinität:  $RA < 10$  und  $DC_{50} > 2h$ ; mittlere Affinität:  $RA > 10$  und  $DC_{50} > 2h$ ; niedrige Affinität:  $RA > 10$  und  $DC_{50} < 2h$ .

EPITOP	SEQUENZ	RA	$DC_{50}$ (H)	AFFINITÄT
MUC1 <sub>9-17</sub>	STAPPAHGV	67	1,2	niedrig
MUC1 <sub>950-958</sub>	STAPPVHNV	45	0	niedrig
HTERT <sub>540-548</sub>	ILAKFLHWL	7,7	7,3	hoch
WT1 <sub>235-243</sub>	CMTWNQMNL	16	6,2	mittel

Die Ergebnisse demonstrieren generell, daß

- neben den primären auch die sekundären Ankerreste die Bindung eines Peptids an das MHC Klasse I-Molekül positiv beeinflussen können,
- die Bindungsaffinität RA eines Peptids in der Regel mit seiner Stabilisierungskapazität  $DC_{50}$  korreliert und
- die effiziente proteasomale Generierung eines Epitops nicht mit dessen stabiler Bindung an das MHC Klasse I-Molekül einhergeht.

Die Beobachtung, daß schlecht bindende Peptide besonders effizient proteasomal generiert werden, konnte von zwei weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe bestätigt werden (Ulrike Seifert, Britta Strehl; persönliche Mitteilung). Insbesondere erwies sich das Epitop MUC1<sub>950-958</sub> als subdominantes, schwach an HLA-A2.1 bindendes Epitop. Diese Beobachtung könnte neben den anderen beschriebenen Umständen für den Verlust der MUC1<sub>950-958</sub>-spezifischen CTLs verantwortlich sein.

### 3.4 *IN VIVO* CTL-INDUKTION NACH PLASMID-IMMUNISIERUNG VON HHD-MÄUSEN

Die Immunoblot- und FACS-Analysen hatten Unterschiede zwischen den Plasmiden hinsichtlich der Stabilität bzw. Degradation der ubiquitinierten Polyepitop-Konstrukte aufgedeckt. Die Frage, ob eine verstärkte Degradation mit einer erhöhten MHC Klasse I-Peptid-Präsentation korreliert, konnte wegen fehlender Daten aus dem Cytotoxizitätsassay nicht beantwortet werden. Im Anschluß an die *in vitro* Experimente sollten die Plasmide auf ihre Fähigkeit untersucht werden, *in vivo* eine HLA-A2.1-abhängige und MUC1<sub>950-958</sub>-spezifische CTL-Antwort zu induzieren. Die gewählte MUC1<sub>950-958</sub>-Sequenz hat keine Homologie in der Maus (Spicer *et al.* 1991), so daß davon ausgegangen werden kann, daß keine Toleranz gegenüber MUC1<sub>950-958</sub> in der Maus vorliegt. HHD-Mäuse wurden mit den Polyepitop-Plasmiden dreimal intramuskulär immunisiert und den Tieren anschließend die Milzen zur Analyse entnommen.

Der im Folgenden durchgeführte Assay diente der Ermittlung der IFN $\gamma$ -Sekretion durch antigenspezifische Lymphozyten. IFN $\gamma$  wird von aktivierten CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> Gedächtnis- und Effektor-T-Lymphozyten sowie von NK-Zellen sezerniert. Das Cytokin spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Immunantworten gegen intrazelluläre Pathogene und Tumoren. Der IFN $\gamma$ -Sekretionsassay ermöglicht die Detektion und Quantifizierung IFN $\gamma$ -sezernierender Zellen nach einer kurzen Phase der *in vitro* Stimulation mit dem entsprechenden Antigen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Milzzellen Plasmid-immunisierter Mäuse über Nacht mit dem Peptid MUC1<sub>950-958</sub> inkubiert. Dies sollte spezifische T-Lymphozyten zur IFN $\gamma$ -Produktion anregen, welche über einen Antikörperrnachweis im Durchflußzytometer analysiert werden konnte. Es wurde jedoch in keiner der untersuchten Proben eine IFN $\gamma$ -Sekretion nachgewiesen, mit Ausnahme der Positivkontrollen, die einer Inkubation mit dem Superantigen SEB (*Staphylococcus Enterotoxin B*) unterzogen waren. Der Grund für diese Beobachtung könnte darin liegen, daß der Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Milz von HHD-Mäusen mit 5% +/- 4% im Vergleich zu Mäusen vom Wildtyp C57Black/6 (31% +/- 7%) stark reduziert ist (Firat *et al.* 2002). Dieser Umstand beeinträchtigte möglicherweise die Untersuchungen zur Quantifizierung MUC1<sub>950-958</sub>-spezifischer CTLs in ihrer Sensitivität. Vor der zweiten Durchführung des Versuchs wurden daher die Milzzellen zur Anreicherung von CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten einer einwöchigen *in vitro* Restimulation mit IL-2 unterzogen, einem Interleukin zur Anregung der T-Zell-Proliferation.

Aus Abbildung 25 B geht hervor, daß einzelne stark positive Reaktionen in jeder Mausgruppe zu verzeichnen waren, einschließlich jedoch der Negativkontroll-Gruppe, die mit dem Plasmid pCI-Mock immunisiert war. Der IFN $\gamma$ -Hintergrund der Proben ohne Stimulation überstieg im vorliegenden Fall mit 1,5-3,5% den Sollwert von deutlich unter 1% (Abb.25A).

Der Grund hierfür liegt vermutlich in der dem Assay vorausgegangenen IL-2-Behandlung, welche unter anderem die IFN $\gamma$ -Sekretion anregt.

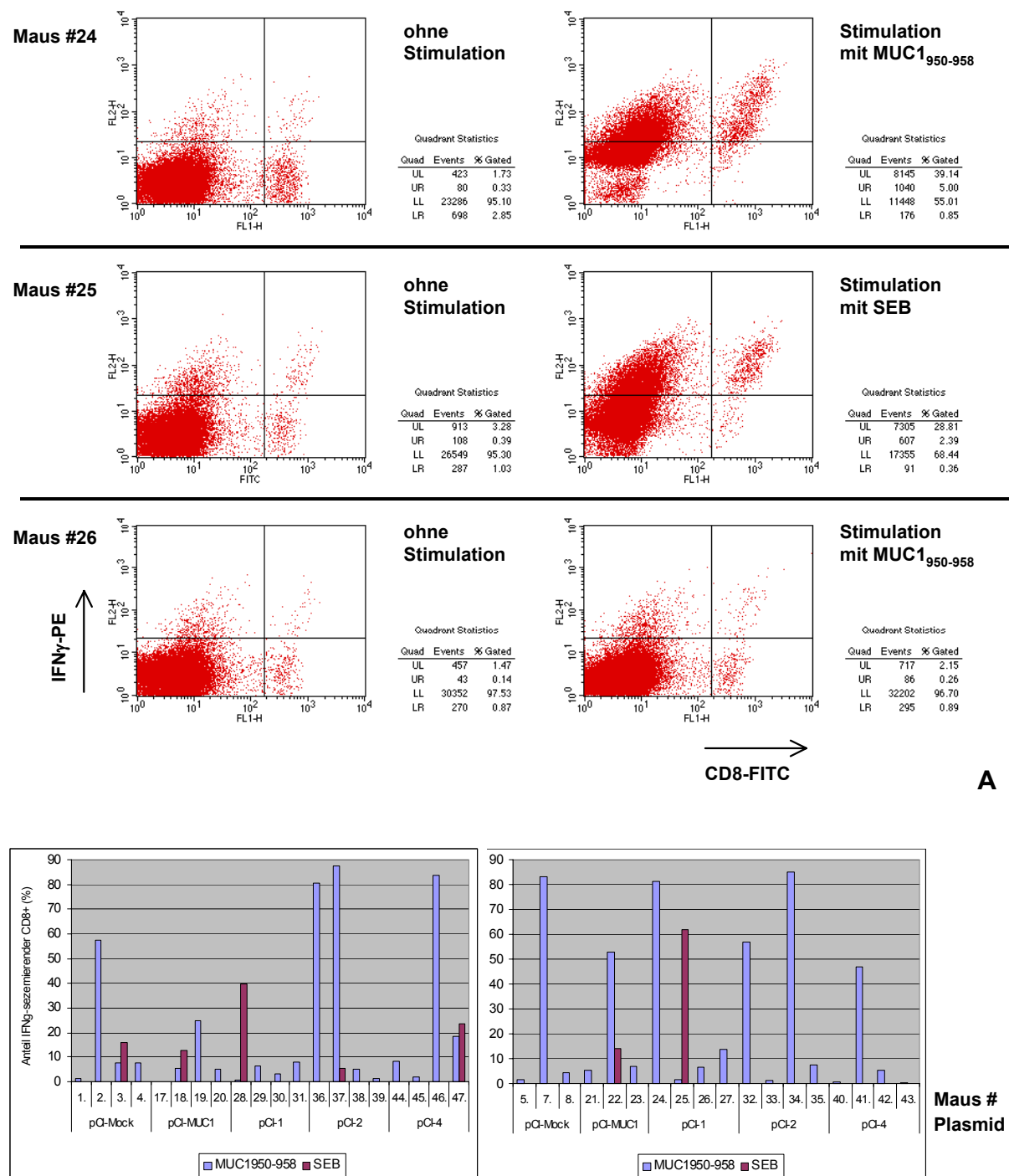


Abb. 25: IFN $\gamma$ -Sekretionsassay zur Quantifizierung der *in vivo* CTL-Induktion nach Plasmid-Immunisierung von HHD-Mäusen. 5 Gruppen mit jeweils 7-8 HHD-Mäusen wurden dreimal in Intervallen von 14 Tagen intramuskulär mit je 100  $\mu$ g Plasmid immunisiert. 14 Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Milzzellen für eine Woche mit IL-2 *in vitro* restimuliert. (A) FACS Dot Plot am Beispiel von drei Tieren aus der Plasmid 1-immunisierten Gruppe. Die Milzzellen wurden ü.N. ohne Antigen (Negativkontrolle), mit Peptid MUC1<sub>950-958</sub> oder mit SEB (Positivkontrolle) inkubiert und am nächsten Tag mit einem IFN $\gamma$ -Antikörper markiert. (B) Anteil IFN $\gamma$ -sezernierender

Zellen an allen CD8<sup>+</sup> Zellen nach Antigenstimulation abzüglich des Anteils INF $\gamma$ -sezernierender Zellen ohne Antigenstimulation. Die beiden Graphiken entsprechen zwei getrennt voneinander durchgeführten Experimenten. SEB: *Staphylococcus Enterotoxin B*.

Anhand der drei Tiere #24, #25 und #26 soll verdeutlicht werden, wie die Dot Plot-Darstellungen (Abb.25A) zu verstehen sind. Bei Maus #24 hat während der Peptidstimulation über Nacht vermutlich ein sogenanntes *cross feeding* stattgefunden, da kaum INF $\gamma$  negative Zellen vorhanden sind. Wahrscheinlich lag während der Sekretionsphase zu viel INF $\gamma$  in der Zellsuspension vor, welches sich auf alle Nachbarzellen verteilt hatte. Möglicherweise erfordert die Peptidstimulation eine kürzere Inkubationsphase, da das Antigen direkt von außen auf die Zellen geladen wird und nicht mehr prozessiert werden muß. Maus #25 ist ein Beispiel für die Positivkontrolle unter SEB-Stimulation, bei der eine deutliche Population INF $\gamma$  negativer Zellen zu verzeichnen ist (Quadrant unten links, 68%). Die Frequenz der INF $\gamma$  positiven Zellen liegt bei 31% (Quadranten oben rechts plus oben links), einem realistischen Anteil, da nach einwöchiger *in vitro* Kultur hauptsächlich T-Lymphozyten überlebt und proliferiert haben sollten. Maus #26 scheint als Beispiel für ein nicht-reaktives Tier nur wenige oder keine Epitop-spezifischen T-Lymphozyten als Antwort auf die Immunisierung gebildet zu haben. Der Assay kann aufgrund der beschriebenen technischen Komplikationen nicht für eine verlässliche Aussage zur Induktion einer MUC1<sub>950-958</sub>-spezifischen CTL-Antwort nach Plasmid-Immunisierung herangezogen werden.

Der vorliegende methodische Ansatz zur Entwicklung einer Tumorstoffimpfung wurde durch das Zusammenspiel von drei verschiedenen Faktoren erschwert: Die Verwendung

- eines subdominanten Tumorepitops,
  - eines schwach immunogenen Vektors in Form eines Plasmids
  - sowie des Mausmodells HHD mit einer reduzierten Gesamtzahl an CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten
- führte dazu, daß sich das gewählte System als ungeeignet zur Generierung einer Polyepitop-Vakzine gegen Tumoren erwies. Die Arbeit zeigt daher auf, daß erst die zweckmäßige Kombination aus Antigen, Vektor und Tiermodell dazu beiträgt, technische Schwierigkeiten bei der Induktion einer Immunantwort zu umgehen.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 IN VITRO 20S DEGRADATION VON POLYPEPTIDEN

Das Proteasomensystem ist Teil eines hochselektiven Prozesses zur Regulation des Abbaus verschiedenster zellulärer Proteine. Die Hauptkomponente stellt das 26S Proteasom dar, welches für den selektiven Abbau polyubiquitinerter Proteinsubstrate verantwortlich ist. Diese umfassen neben zellulären Proteinen fehlerhafter oder kurzlebiger regulatorischer Natur auch virale sowie cytosolisch lokalisierte bakterielle Proteine. Das 26S Proteasom besteht aus einer katalytischen Einheit, der 20S Kernkomponente, und zwei 19S regulatorischen Einheiten, die der Bindung, Deubiquitinierung, Entfaltung und Translokation ubiquitinerter Substrate dienen. In Vertebraten spielt das Proteasomensystem eine zentrale Rolle bei der Generierung der Mehrzahl antigener Peptide, die MHC Klasse I-restringiert auf der Zelloberfläche präsentiert werden (Kloetzel 2001; Rock *et al.* 2002). Obwohl auch „freie“ 20S Proteasomen in der Zelle vorliegen (Tanahashi *et al.* 2000), wurde bislang davon ausgegangen, daß *in vivo* das 26S Proteasom die wichtigste Rolle bei der Epitopgenerierung spielt. Aufgrund der experimentell einfacheren Handhabung werden für *in vitro* Degradationsexperimente jedoch ausschließlich aufgereinigte 20S Proteasomen und längere Peptidsubstrate eingesetzt. Diese Vorgehensweise wird durch Publikationen gerechtfertigt, die eine Übereinstimmung zwischen der *in vitro* 20S proteasomalen Peptidgenerierung und der *in vivo* Epitoppräsentation demonstrieren konnten, und zwar sowohl in qualitativer als auch in kinetischer Hinsicht (Eggers *et al.* 1995; Schwarz *et al.* 2000; Sijts *et al.* 2000). Verschiedene experimentelle Indizien weisen außerdem neuerdings auf einen wichtigen Beitrag des 20S Proteasoms bei der Generierung antigener Peptide hin (Kloetzel 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurden zehn verschiedene Polyepitope aus Tumor-assoziierten Antigenen (Tab.6; siehe auch Klappentext) in einem *in vitro* 20S Verdau sowohl mit konstitutiven als auch mit Immunoproteasomen untersucht. Immunoproteasomen besitzen im Vergleich zu konstitutiven Proteasomen eine abweichende Schnittpräferenz und verbessern in vielen Fällen die Generierung immundominanter Epitope (Sijts *et al.* 2000). Um den Erfolg einer Immunisierung zu gewährleisten, sollte daher in einer Vakzinierungsstudie geklärt werden, ob ein Tumorepitop unabhängig von der proteasomalen Ausstattung einer Zelle generiert werden kann. Neben den Tumorzellen selbst müssen im Fall einer intramuskulären Immunisierung auch Myozyten bzw. professionelle Antigen-präsentierende Zellen in der Lage sein, das Antigen zu prozessieren und zu präsentieren.

#### 4.1.1 Defiziente Degradation der hTERT-Polyepitope

Acht der zehn analysierten Polyepitope beinhalten die Sequenz für das Tumorantigen hTERT<sub>540-548</sub> (ILAKFLHWL). Dieses war mittels eines Vorhersageprogramms



([http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/)) als besonders stabil an HLA-A2.1 bindendes Telomeraseepitop identifiziert worden (Minev *et al.* 2000; Vonderheide *et al.* 1999). Die hohe Affinität von hTERT<sub>540-548</sub> an HLA-A2.1 konnte in der hier vorliegenden Arbeit durch Bindungs- und Stabilisierungsexperimente bestätigt werden. Das Epitop zeichnet sich durch verschiedene Aminosäurereste aus, welche die Bedingungen für eine stabile MHC-Peptid-Interaktion erfüllen: Leucin an Position P2 stellt einen Anker dar, Leucin an P9 einen sekundären Anker und Lysin an P4 eine Bindungspräferenz (Rammensee *et al.* 1995).

Darüber hinaus konnte in den zitierten Untersuchungen von Minev *et al.* und Vonderheide *et al.* gezeigt werden, daß hTERT<sub>540-548</sub> von hTERT<sup>+</sup> Tumorzellen MHC Klasse I-abhängig präsentiert wird und die Expansion spezifischer CTLs aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern und Tumorpatienten ermöglicht. Diese Befunde weisen darauf hin, daß das immunogene hTERT-Epitop die Bildung von Vorläuferlymphozyten im peripheren adulten CTL-Repertoire induziert. Als Voraussetzung dafür muß eine effiziente Generierung des Epitops erfolgen. In keiner der beiden Untersuchungen wurde jedoch der Frage nachgegangen, ob diese Generierung durch das Proteasomensystem erfolgt.

Entgegen den Erwartungen wurde in der vorliegenden Arbeit keines der acht untersuchten hTERT<sub>540-548</sub>-Polyepitope *in vitro* 20S proteasomal degradiert, weder von konstitutiven noch von Immunoproteasomen. Auch die Zugabe von PA28 zu einem der Degradationsansätze änderte nichts an diesem Befund. Die verschiedenen hTERT-Polyepitope beherbergen einige hydrophobe und basische Reste, die präferentielle Schnittstellen des Proteasoms darstellen. Insbesondere das C-terminale Leucin des Epitops wäre als ein geeignetes Substrat der  $\beta$ 1- und  $\beta$ 5-Untereinheit des Proteasoms zu erwarten. Besonders auffallend ist die Tatsache, daß das Epitop auch nicht aus seinem natürlichen Sequenzkontext (Pep165) generiert wurde. Diese Beobachtung scheint den zuvor vorgestellten Daten einer *in vivo* Prozessierung und Präsentation zu widersprechen.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch die Gruppe von Danila Valmori, die sich ebenfalls mit der Nutzung des Epitops hTERT<sub>540-548</sub> als Tumorstoffimpfung beschäftigte (Ayyoub *et al.* 2001). In dieser Arbeit konnten hTERT<sub>540-548</sub>-spezifische CTLs aus Melanomapatienten nachgewiesen werden, die zur Lyse Epitop-beladener Zielzellen fähig waren. hTERT-exprimierende Zielzellen wurden hingegen nicht lysiert, auch nicht nach der Behandlung mit IFN $\gamma$ , einem Cytokin, welches unter anderem die Bildung von Immunoproteasomen und die Expression von PA28 induziert. Die Zielzellen wurden außerdem dann von spezifischen CTLs erkannt, wenn sie mit einem Minigen-Plasmid transfiziert waren, welches nur für die Epitopsequenz codierte. Dessen N- oder C-terminale Verlängerung im Plasmid führte jedoch zu einer starken Abnahme der Erkennung. Dies bedeutet, daß zwar das Epitop endogenen Ursprungs erkannt wird, seine zelluläre Generierung jedoch unzureichend für eine effiziente

MHC Klasse I-Präsentation ist. In der Untersuchung von Ayyoub *et al.* wurde anschließend ein *in vitro* Verdau mit Affinitätschromatographie-aufgereinigten 20S konstitutiven und Immunoproteasomen durchgeführt. Die Degradation des Peptids hTERT<sub>514-554</sub>, vergleichbar mit dem in dieser Arbeit untersuchten Peptid Pep165, war nur wenig effizient. Es konnte mittels massenspektrometrischer Analysen zwar die N-terminale Flanke des Epitops, nicht jedoch das Epitop selbst oder seine C-terminal flankierende Sequenz nachgewiesen werden.

Aus diesen Beobachtungen läßt sich schließen, daß an der Generierung des hTERT-Epitops eine andere Protease als das Proteasom beteiligt sein muß. Eine Reihe cytosolischer Aminopeptidasen einschließlich der multimeren, über 3,5 MDa großen Tripeptidylpeptidase-II (TPPII) (Geier *et al.* 1999) sowie die ER-lokalisierten Peptidasen ERAP1 (Saric *et al.* 2002; Serwold *et al.* 2002) und L-RAP (Tanioka *et al.* 2003) sind an der Prozessierung antigener Peptide beteiligt. In den meisten Fällen übernimmt das Proteasom die Generierung des C-Terminus der Epitope, während für das anschließende N-terminale *trimming* andere Aminopeptidasen verantwortlich sind. Es sind aber auch einige MHC Klasse I-Epitope bekannt, die Proteasomen-unabhängig generiert werden (Benham *et al.* 1998; Choppin *et al.* 2001; Luckey *et al.* 2001). TPPII wurde als erste nicht-proteasomale Protease identifiziert, die mittels ihrer endoproteolytischen Aktivität für die Generierung eines MHC Klasse I-Epitops verantwortlich ist (Seifert *et al.* 2003). Es ist nicht auszuschließen, daß TPPII trotz ihrer beschriebenen Spaltpräferenzen nach Lysin und Arginin für die Generierung des Epitops hTERT<sub>540-548</sub> mit C-terminalem Leucin in Betracht kommt. Andere Proteasen, die den C-Terminus eines Epitops generieren, sind bislang nicht bekannt.

Ein weiterer Aspekt, der an dieser Stelle diskutiert werden soll, betrifft die mögliche inhibitorische Wirkung der hTERT-Polypeptide auf das 20S Proteasom. Um dieser Frage nachzugehen, wurden unterschiedliche Experimente durchgeführt, die jedoch im Ergebnisteil dieser Arbeit nicht vorgestellt wurden. Es konnte anhand von *in vitro* Untersuchungen mit kurzen fluorogenen Peptidsubstraten gezeigt werden, daß die Polypeptide, denen die Sequenz für das Epitop hTERT<sub>540-548</sub> gemeinsam ist, einen differentiellen Einfluß auf die einzelnen Aktivitäten des 20S Immunoproteasoms ausüben. Während die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität einer bis zu 95%igen Inhibition unterlag, wurde gleichzeitig die Trypsin-ähnliche Aktivität im Verlauf einer 6h Verdaukinetik stabilisiert. Eine ähnliche Wirkung hat das Peptidanalogen Ritonavir, welches *in vitro* die  $\beta$ 2-Aktivität von 20S stimuliert und die  $\beta$ 5-Aktivität inhibiert und *in vivo* den Abbau einiger proteasomaler Substrate spezifisch hemmt (Andre *et al.* 1998; Gaedicke *et al.* 2002; Schmidtke *et al.* 2000; Schmidtke *et al.* 1999). Zusätzlich konnte eine Konkurrenz der hTERT-Polypeptide mit PA28 um die Bindung an das 20S Proteasom nachgewiesen werden (Abb.26). Vermutlich erfolgt also die Bindung der modulatorischen Peptide nicht an den katalytischen Zentren, sondern an den  $\alpha$ -Ring von 20S. Der genaue Interaktionsmechanismus zwischen den hTERT-Polypeptiden und dem

Proteasom ist noch nicht geklärt. Möglicherweise bestehen Analogien zum Wirkungsmechanismus hydrophober Peptidsubstrate auf das Proteasom, welche die drei katalytischen Aktivitäten durch *gating* Vorgänge am  $\alpha$ -Ring stimulieren (Kisselev *et al.* 1999; Kisselev *et al.* 2003; Kisselev *et al.* 2002).

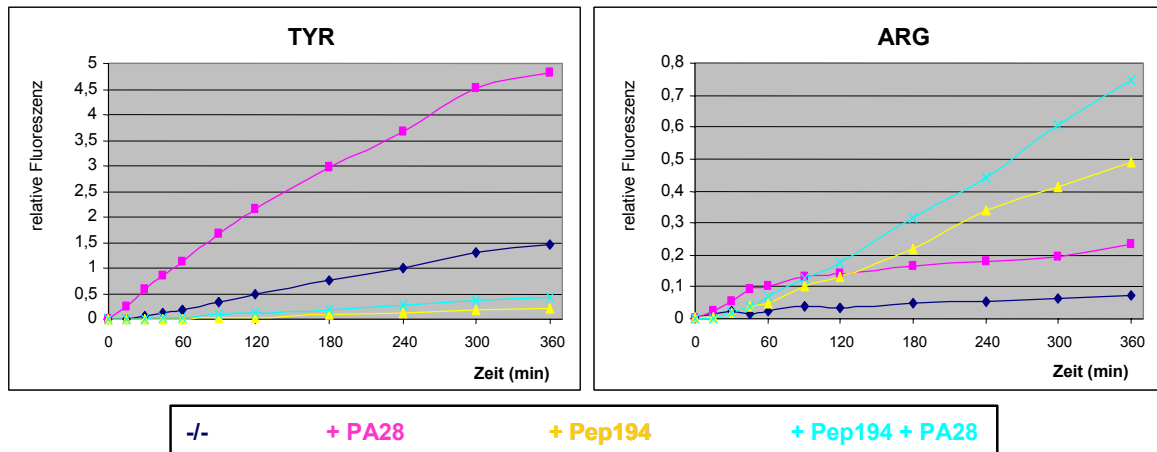


Abb. 26: In vitro Einfluß des hTERT-Polypeptids Pep194 auf die Chymotrypsin- und die Trypsin-ähnliche Aktivität des Immunoproteasoms sowie Kompetiton des Polypeptids mit PA28. 50ng Proteasom wurden mit 10 $\mu$ M des Polypeptids 30min bei RT präinkubiert, bevor die Zugabe von PA28 und jeweils 50 $\mu$ M der Substrate Suc-LLVY-AMC (TYR) bzw. Bz-VGR-AMC (ARG) erfolgte. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und die Messung der Fluoreszenz in Zeitintervallen von 15-30min.

Die Transfektion der hTERT-Polypeptide in HeLa-Zellen führte zur Beeinträchtigung der proteasomalen Aktivität *in vivo*, gemessen am Umsatz des fluorogenen Peptids Z-GGL-AMC. Über eine physiologische Relevanz dieser Inhibition läßt sich nur spekulieren. Verschiedene Peptide und Proteine -in der Regel viralen Ursprungs- sind in der Lage, mit dem Proteasom zu interagieren und dadurch einen meist inhibitorischen Einfluß auf dessen Aktivität ausüben. Beispiele hierfür sind pr39 (Bao *et al.* 2001; Gaczynska *et al.* 2003; Gao *et al.* 2000; Li *et al.* 2000), HBx (Hu *et al.* 1999; Stohwasser *et al.* 2003) und Tat (Apcher *et al.* 2003; Huang *et al.* 2002; Seeger *et al.* 1997). Die Wechselwirkung viraler Antigene mit dem Proteasom kann zur Beeinträchtigung der MHC Klasse I-Präsentation führen und Teil eines *immune escape* Mechanismus darstellen. Es ist nicht auszuschließen, daß das in der vorliegende Arbeit verwendete Telomerase-Polypeptid hTERT<sub>532-556</sub> (Pep165) als natürliches Abbauprodukt in der Zelle vorkommt. Sein inhibitorischer Effekt auf das Proteasom könnte ebenso wie der Effekt der anderen artifiziellen Peptide stellvertretend für den Einfluß im Cytosol akkumulierender Peptide auf das Proteasom stehen. Es wurde gezeigt, daß die doppelte Deletion der beiden cytosolischen Aminopeptidasen Bleomycin-Hydrolase und Puromycin-sensitive Aminopeptidase (Stoltze *et al.* 2000) letal ist (unveröffentlicht). Diese Beobachtung ist möglicherweise nicht auf die unentbehrliche Funktion der einzelnen Aminopeptidasen selbst zurückzuführen. Stattdessen könnte der letale Effekt das Ergebnis der proteasomalen Inhibition durch die im Cytosol akkumulierenden Peptide darstellen.

#### 4.1.2 Effiziente Generierung und niedrige MHC Klasse I-Affinität der MUC1-Epitope

Das Nonamer MUC1<sub>9-17</sub> (STAPPAHGV) wurde als HLA-A2.1-restringiertes Epitop aus dem immundominanten VNTR-Bereich des Tumorantigens MUC1 identifiziert (Domenech *et al.* 1995). In einer späteren Arbeit konnten durch Immunisierung von HLA-A2.1-transgenen Mäusen CTLs gegen das Epitop generiert werden. Trotz der schwachen Bindung von MUC1<sub>9-17</sub> an HLA-A2.1 waren diese CTLs in der Lage, ohne vorherige *in vitro* Restimulation MUC1<sup>+</sup> Tumorzellen zu lysieren (Apostolopoulos *et al.* 1997). Mittels computerbasierter Analysen wurde ein zweites Nonamer MUC1<sub>950-958</sub> (STAPPVHNV) aus dem VNTR-Bereich ermittelt, welches sich von MUC1<sub>9-17</sub> durch den Austausch von zwei Aminosäuren an den Positionen P6 und P8 unterscheidet. Valin an P6 stellt einen sekundären Anker dar und sollte daher die Affinität des zweiten Epitops an HLA-A2.1 erhöhen. Aus dem peripheren Blut HLA-A2.1<sup>+</sup> Spender konnten durch *in vitro* Restimulation MUC1<sub>950-958</sub>-spezifische CTLs generiert werden, welche zur Lyse MUC1<sup>+</sup> Tumorzellen fähig waren (Brossart *et al.* 1999). Die Beobachtung, daß Peptide trotz niedriger MHC Klasse I-Affinität CTLs mit hoher Avidität induzieren können, wurde bereits in anderen Untersuchungen gemacht (Dahl *et al.* 1996; Fairchild and Wraith 1996). Solche Epitope stammen in der Regel von Selbst-Antigenen -also auch Tumorantigenen- und müssen im Rahmen der Lymphozytenselektion im Thymus zur Etablierung der Selbst-Toleranz geführt haben. Vermutlich führt erst ihre Überexpression im Tumor zu einer derart hohen Dichte an MHC-Peptid-Komplexen auf der Zelloberfläche, daß eine Erkennung durch T-Lymphozyten möglich wird.

Die trotz des Ankerrests Valin in Position P9 schwache Bindung der beiden MUC1-Epitope an HLA-A2.1 konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Tab.11). Der zweite Ankerrest in Position P2 ist mit dem kleinen, polaren Threonin ungünstig besetzt. Mit seinem sekundären Ankerrest Valin an Position P6 besitzt MUC1<sub>950-958</sub> erwartungsgemäß eine höhere HLA-A2.1-Affinität als MUC1<sub>9-17</sub>. Beide MUC1-Polypeptide wurden *in vitro* sehr effizient proteasomal degradiert und die Epitope stabil generiert (Abb.10, 11). Der Abbau der MUC1-Polypeptide erfolgte in beiden Fällen schneller durch das Immunoproteasom. Vermutlich läßt sich dessen verstärktes Prozessierungsverhalten, welches bei vielen Substraten beobachtet werden kann, durch den Einbau von Immunountereinheiten erklären, die zu leichten Konformationsänderungen im 20S Proteasom führen und den Einlaß längerer Peptidsubstrate erleichtern (Cascio *et al.* 2001; Peters *et al.* 2002; Sijts *et al.* 2000).

Viele quantitative Aspekte der Antigenprozessierung, insbesondere von Tumorantigenen, sind bislang ungeklärt. Wie hoch ist die Effizienz der Peptidgenerierung? Gibt es Unterschiede in dieser Effizienz zwischen verschiedenen Substraten? Wie hoch sind die Kapazitäten von TAP-Transport und MHC Klasse I-Präsentation? Princiotta *et al.* zeigten anhand viraler Substrate, daß 500-3000 virale Translationsprodukte zur Generierung eines MHC Klasse I-

Peptid-Komplexes prozessiert werden müssen. Sie demonstrierten außerdem, daß das Proteasom eine heterogene Kapazität bezüglich der Generierung von MHC Klasse I-Liganden aufweist (Princiotta *et al.* 2003). In Abhängigkeit von ihrer Avidität benötigen CD8<sup>+</sup> T-Zellen für ihre Aktivierung den Kontakt zu einigen zehn bis einigen hundert MHC Klasse I-Peptid-Komplexen. Angesichts der vorliegenden Ergebnisse zur Generierung und MHC Klasse I-Affinität der untersuchten Tumorepitope läßt sich die Vermutung anstellen, daß für Epitope mit geringer Affinität (MUC1<sub>950-958</sub>) die effiziente proteasomale Generierung wichtiger ist als für solche mit hoher Affinität (hTERT<sub>540-548</sub>). Es ist davon auszugehen, daß das Proteasom die Menge der präsentierten Epitope „sortiert“ und damit zum quantitativen Charakter der Immunantwort beiträgt.

Warum konnte in der vorliegenden Arbeit nach Plasmid-Immunisierung keine MUC1<sub>950-958</sub>-spezifische CTL-Induktion nachgewiesen werden? Neben den zuvor erwähnten technischen Schwierigkeiten durch die Verwendung eines subdominanten Epitops und des HHD-Mausmodells kommt eine weitere Erklärung für diese Beobachtung in Betracht. In zwei Untersuchungen zur intramuskulären Vakzinierung von MUC1<sub>ges</sub>-Plasmid in C57Black/6 Mäuse wurde zwar eine Protektion gegen einen MUC1<sup>+</sup> Tumor erzielt; vor der Injektion der Tumorzellen konnten jedoch keine spezifischen CTLs in den Milzzellen immunisierter Mäuse detektiert werden (Graham *et al.* 1996; Plunkett *et al.* 2004). Zu demselben Ergebnis kam eine weitere Untersuchung zur intramuskulären Vakzinierung von MUC1<sub>ges</sub>-DNA, die außerdem das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Plasmid pCI verwendete (Johnen *et al.* 2001). Möglicherweise induziert die DNA-Immunisierung nur wenige Vorläufer-CTLs, die erst nach der Tumorgabe auf ein quantifizierbares Niveau expandieren. Dies würde erklären, warum nach der Immunisierung mit den Polyepitop-Plasmiden ohne vorherige *in vitro* Restimulation keine spezifischen T-Lymphozyten nachgewiesen werden konnten.

#### 4.1.3 Ausblick: Das duale Proteasomen-Modell

*In vitro* Degradationsexperimente mit isoliertem 20S Proteasom und Polypeptiden aus bis zu 45 Aminosäuren reflektieren häufig entsprechende *in vivo* Beobachtungen zur proteasomalen Aktivität mit CTLs als Readout (Gileadi *et al.* 1999; Morel *et al.* 2000; van Hall *et al.* 2000). Diese Übereinstimmung ist angesichts von Hinweisen bemerkenswert, die in einigen Fällen dem 26S Proteasom ein anderes Muster der *in vitro* Fragmentgenerierung aus nicht-ubiquitinierten Substraten zuschreiben als dem 20S Proteasom (Cascio *et al.* 2001; Emmerich *et al.* 2000; Kisselev *et al.* 1999). Verschiedene experimentelle Indizien attestieren dem 20S Proteasom eine wichtige Rolle bei der Generierung antigener Peptide *in vivo*:

- Das 26S Proteasom ist in der Lage, durch limitierte Proteolyse funktionelle Proteine einer Länge von über 100 Aminosäuren zu generieren. Ein Beispiel hierfür ist die Prozessierung von p105 durch einen endoproteolytischen Schnitt zur NF-κB-Untereinheit p50 (Lin *et al.*

1998). Es ist daher denkbar, daß der Abbau ubiquitiniert Substrate durch das 26S Proteasom nicht vollständig erfolgt, sondern freigesetzte größere Peptidintermediate anschließend von anderen Proteasen wie TPPII und dem 20S Proteasom prozessiert werden.

- Das immunmodulatorische Cytokin IFN $\gamma$  koppelt das Immunsystem an das Proteasomensystem, indem es sowohl die Synthese der proteasomalen Immununtereinheiten als auch die des Proteasomenaktivators PA28 induziert. Es erhöht außerdem die Antigenpräsentation durch Verstärkung der Expression von MHC und TAP. Es konnte gezeigt werden, daß das IFN $\gamma$ -Signal auch zur Dephosphorylierung der proteasomalen  $\alpha$ 7-Untereinheit und damit zur Disassemblierung des 26S Proteasoms führt (Bose *et al.* 2004). Das immunstimulatorische Signal scheint also den Anteil des freien, das heißt nicht mit 19S assoziierten 20S Proteasoms in der Zelle zu erhöhen.
- Die Untersuchung der intrazellulären Komplexbildung von PA28 ergab, daß ein erheblicher Anteil von PA28 nach IFN $\gamma$ -Induktion in Form von PA28-20S-PA28 vorliegt (Tanahashi *et al.* 2000). Durch die Bindung an freies 20S könnte PA28 eine dem 26S Proteasom nachgeschaltete Funktion in der Antigenprozessierung ausüben.
- Das zelluläre Protein PI31 bindet an die  $\alpha$ -Ringe des 20S Proteasoms, inhibiert *in vitro* die 20S proteasomale Aktivität und kompetiert mit PA28 (McCutchen-Maloney *et al.* 2000; Zaiss *et al.* 1999). *In vivo* führt die Überexpression von PI31 nicht zur Inhibition der Ubiquitin-abhängigen Proteolyse, sondern zur Hemmung der Epitopgenerierung und -präsentation durch Beeinträchtigung der 20S proteasomalen Aktivität (Zaiss *et al.* 2002).

Trotz dieser Hinweise ist die Funktion freier 20S Proteasomen in der Zelle noch nicht hinreichend geklärt. Gleichzeitig liegen nur wenige genau kontrollierbare Experimente vor, die den Substratabbau durch das 26S Proteasom beschreiben. Insbesondere wäre die Charakterisierung der Degradationsprodukte polyubiquitiniert Substrate ein wichtiger Hinweis auf den Beitrag des 26S Proteasoms bei der Antigengenerierung. Werden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Ubiquitin-Fusionskonstrukte des MUC1-Polyepitops in der Zelle so prozessiert, daß in Analogie zu den 20S *in vitro* Ergebnissen das Epitop effizient generiert wird? Ein Cytotoxizitätsassay hätte in der vorliegenden Arbeit darüber Aufschluß geben können. In Ermangelung dieser Daten ist es denkbar, auf ein anderes Verfahren zur Beantwortung dieser Frage zurückzugreifen. In unserer Arbeitsgruppe wird zur Zeit ein experimentelles System etabliert, bei dem Substrate tetraubiquitiniert, in einen 26S Verdau eingesetzt und die Spaltprodukte massenspektrometrisch analysiert werden können. Daher wurde das MUC1-Polyepitop mit N-terminal fusioniertem Ubiquitin in ein bakterielles Expressionsplasmid kloniert, exprimiert und aufgereinigt. Der Einsatz dieses Fusionskonstrukts in einem 26S proteasomalen Verdau wird Informationen zur Aufklärung der angesprochenen Fragestellung liefern können.

## 4.2 UBIQUITIN-FUSIONSKONSTRUKTE – VERBESSERUNG DES PROTEASOMALEN ABBAUS?

Um im Rahmen einer Vakzinierung ein Protein gezielt in den proteasomalen Abbauweg zu befördern und somit seiner Erkennung durch das Immunsystem zugänglich zu machen, wurden verschiedene Untersuchungen veröffentlicht, die sich die unterschiedlichen Mechanismen des Zusammenspiels von Ubiquitinierung und 26S Proteasom zunutze machten. Bezüglich des Einflusses von Ubiquitin auf den Erfolg einer Plasmid-Vakzinierung kommen diese Untersuchungen (Übersicht in Tab.8) jedoch nicht immer zu denselben Ergebnissen. Mögliche Ursachen hierfür liegen in der Verwendung unterschiedlichster Vektoren, Modellantigene, Ubiquitinierungsstrategien und Readout-Methoden. Diese Methoden sind weitestgehend immunologischer Natur und befassen sich nur in Einzelfällen mit den intrazellulären Vorgängen der Degradation ubiquitinierten Substrate. In der vorliegenden Arbeit wurden daher anhand des zuvor vorgestellten MUC1-Polyepitops und des GFP-Reporterproteins verschiedene Strategien zur effizienten Ubiquitin-vermittelten Degradation untersucht und miteinander verglichen. Diese Strategien werden im Folgenden erläutert und die vorliegenden Ergebnisse in ihrem Kontext diskutiert.

### 4.2.1 Konstrukt 5 ohne Ubiquitin – kein proteasomales Substrat

Einen wichtigen Schritt der 26S proteasomalen Kaskade stellt die Erkennung des Substrats durch eine von zahlreichen E3 Ubiquitinligasen dar, gefolgt von der kovalenten Anheftung einer Polyubiquitinkette als Degradationssignal (Glickman and Ciechanover 2002; Pickart 2004). Obwohl dieser Mechanismus bisher nur für wenige Substrate gezeigt wurde, wird in der Regel davon ausgegangen, daß das erste Ubiquitinmolekül über seinen C-terminalen Glycinrest (G76) durch eine kovalente Isopeptidbindung an die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Substrat-internen Lysinrests geheftet wird. Die sukzessive Ankopplung weiterer aktivierter Ubiquitine an den Ubiquitin-internen Lysinrest K48 führt zur Generierung der Polyubiquitinkette, ein Prozeß, der noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Nach heutigem Kenntnisstand unzweifelhaft ist hingegen die Annahme, daß ein Proteinsubstrat ein E3 Erkennungsmotiv und eine Ubiquitinbindungsstelle benötigt. Beispielsweise wurden für I $\kappa$ B $\alpha$  die Lysine K21 und K22 als spezifische Ubiquitinierungsreste identifiziert (Scherer *et al.* 1995), während in Cyclin B (King *et al.* 1996) oder in der  $\alpha$ -Kette des T-Zell-Rezeptors (Hou *et al.* 1994) jeder Lysinrest als Ubiquitinakzeptor dienen kann. Die meisten dieser Untersuchungen basieren auf Mutationsanalysen, und nur wenige haben die kovalente Ubiquitinierung direkt mittels Edman-Abbau oder Massenspektrometrie nachgewiesen (Goldknopf and Busch 1977; Gronroos *et al.* 2002). Bislang konnte zudem nur ein Protein identifiziert werden, dessen *in vivo* Abbau durch das 26S Proteasom keine Ubiquitinierung vorausgeht. Das Enzym Ornithin-Decarboxylase (ODC) ist ein kurzlebiges Protein, dessen Degradation unter ATP-Verbrauch und nur in Anwesenheit eines spezifischen Cofaktors, des

sogenannten Antizyms, erfolgt. Die Bindung an Antizym ist Voraussetzung zur Erkennung und Proteolyse von ODC durch das 26S Proteasom (Li and Coffino 1992).

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Polyepitop 4xMUC1<sub>950-958</sub> besitzt kein internes Lysin, so daß im Vorhinein die Vermutung angestellt werden konnte, daß dieses kurze Konstrukt *in vivo* kein Substrat des 26S Proteasoms darstellt. Ob infolgedessen das Konstrukt in der Zelle stabil ist oder durch andere Proteasen abgebaut wird, konnte aufgrund seiner geringen Größe im Immunoblot nicht gezeigt werden. Die GFP-Fusionsvariante des Polyepitops zeichnet sich durch mehrere Lysinreste im GFP aus und könnte somit ein Substrat zur posttranslationalen Ubiquitinierung und proteasomalen Degradation darstellen. Es existieren GFP-Fusionskonstrukte z.B. mit viralen Proteinen, die proteasomal degradiert werden (Bellanger *et al.* 2001; Tellam *et al.* 2001). In seiner hier vorliegenden Fusion an das MUC1-Polyepitop erwies sich GFP jedoch als metabolisch so stabil, daß unter MG132-Behandlung kaum eine zusätzliche Anreicherung beobachtet werden konnte (Abb.18). Ähnliche Beobachtungen zur Stabilität von nicht-ubiquitiniertem GFP wurden auch von anderen Gruppen gemacht (Guterman and Glickman 2004; Qian *et al.* 2002; Tellam *et al.* 2001).

#### 4.2.2 Konstrukte 1 und 3 – Deubiquitinierung und N-End-Regel

Eine Strategie zur Aufhebung der *in vivo* Stabilität eines Proteins beruht auf der von Varshavsky 1986 postulierten N-End-Regel. Diese Regel entwirft eine Beziehung zwischen der metabolischen Stabilität eines Proteins und der Identität seiner N-terminalen Aminosäure (Bachmair *et al.* 1986; Gonda *et al.* 1989; Varshavsky 1996). Der N-terminale Rest soll als Erkennungs- und Bindungsmotiv für eine E3 Ubiquitinligase dienen, während die anschließende (Poly-) Ubiquitinierung an einem Substrat-internen Lysin erfolgt (Bachmair and Varshavsky 1989; Chau *et al.* 1989). Für die zitierten Untersuchungen wurden verschiedene Fusionsproteine aus Ubiquitin und  $\beta$ -Galactosidase (Ub-X- $\beta$ -Gal) in *S.cerevisiae* exprimiert. Sie machten sich die Abspaltung von linear fusioniertem Ubiquitin nach seinem C-terminalen Rest G76 durch cytosolische deubiquitinierende Enzyme zunutze. Diese Abspaltung erfolgte unabhängig von der darauffolgenden Aminosäure X -mit einer Ausnahme: X = Prolin- und führte zu freien  $\beta$ -Gal-Proteinen mit unterschiedlichen N-Termini X. Diese Proteine zeichneten sich durch eine große Variabilität ihrer *in vivo* Halblebenszeiten aus, die sich von >20h bis <3min erstreckten. Die verschiedenen N-terminalen Aminosäuren konnten daher bezüglich der durch sie an  $\beta$ -Gal verliehenen Halblebenszeit klassifiziert werden. Derselbe Mechanismus wurde auch in Mammalia nachgewiesen und hierbei unter anderem Arginin als primär destabilisierende Aminosäure identifiziert (Gonda *et al.* 1989).

Der Mechanismus der Substraterkennung durch DUBs und die anschließende Deubiquitinierung sind noch nicht hinreichend aufgeklärt. DUBs können aufgrund ihrer



Größe, Sequenzhomologien und aktiven Zentren in zwei große Familien eingeteilt werden: Ubiquitin-prozessierende Proteasen (UBPs) und Ubiquitin C-terminale Hydrolasen (UCHs) (Wilkinson 1997). Beim Menschen werden UBPs von über 60 verschiedenen Genen codiert und dienen insbesondere der Ubiquitinabspaltung von großen Substraten und Polyubiquitinketten. Die kleineren UCHs hingegen werden im humanen Genom bislang nur von vier bekannten Genen codiert und entfernen Ubiquitin von kleineren Peptiden (Wilkinson 2000). Aufgrund ihrer Variabilität könnten DUBs in Analogie zu den E3 Ubiquitinligasen für bestimmte Ubiquitin-Substrat-Konfigurationen spezifisch sein. Da jedoch in der Hefe kein DUB essentiell ist (Amerik *et al.* 2000), üben die DUBs wahrscheinlich auch übergreifende Funktionen aus. Verschiedene Untersuchungen weisen darauf hin, daß auch der 19S Regulator des Proteasoms eine intrinsische deubiquitinierende Aktivität besitzt. Die hochkonservierte *lid* Untereinheit Rpn11 wurde als eine deubiquitinierende Metalloprotease identifiziert (Verma *et al.* 2002; Yao and Cohen 2002), und das mit *base* assoziierte Ubp6/USP14 katalysiert die Abspaltung von proximalen Ubiquitinresten (Borodovsky *et al.* 2001; Leggett *et al.* 2002). Neuerdings konnte gezeigt werden, daß die im 19S Regulator lokalisierten deubiquitinierenden Aktivitäten *in vitro* auch monoubiquitinierte Substrate angreifen können (Guterman and Glickman 2004). Möglicherweise reicht also eine einzelne Ubiquitinuntereinheit aus, um ein stabiles Proteinsubstrat dem proteasomalen Abbau *in vivo* zuzuführen (Chernova *et al.* 2003; Hanna *et al.* 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurden basierend auf der N-End-Regel zwei Polyepitop-Konstrukte jeweils mit und ohne GFP-Insert entworfen (Plasmide 1 und 3; Abb.13; siehe auch Klappentext). Der Schnitt nach UbG76 generiert die N-terminalen Aminosäuren Glycin im Konstrukt 1 und Arginin im Konstrukt 3. Glycin gilt ebenso wie die Start-Aminosäure Methionin der N-End-Regel zufolge als stabilisierend, während Arginin eine destabilisierende Wirkung haben soll. Delogu *et al.* konnten anhand von Immunoblotanalysen zeigen, daß sich ein Plasmid-Konstrukt UbG76-R-X (X: *M.tuberculosis* Antigen MPT64) besonders instabil im Vergleich zum Konstrukt UbG76-X verhielt. Diese Beobachtung ging mit einer erhöhten IFN $\gamma$ -Produktion nach Immunisierung von Mäusen mit dem Plasmid UbG76-R-X einher (Delogu *et al.* 2000). Zu denselben Ergebnissen kamen auch Tellam *et al.* anhand einer Untersuchung mit dem EBV-Substrat EBNA1, die insbesondere auch das Reporterprotein GFP für ihre Immunoblotanalysen verwendeten (Tellam *et al.* 2001). In einer weiteren Arbeit mit dem Ubiquitin-Fusionsprotein HIV1-Nef konnte die verringerte Halblebenszeit von Ub-R-Nef im Vergleich zu Ub-M-Nef mit einer erhöhten Nef-spezifischen CTL-Aktivierung korreliert werden (Tobery and Siliciano 1997).

Bei den vier in der vorliegenden Arbeit verwendeten UbG76-Plasmiden wurde übereinstimmend eine Anreicherung der Konstrukte nach MG132-Behandlung nachgewiesen (Abb.17, 18). Diese Beobachtung ist ein klarer Hinweis auf ihre proteasomale Degradation, welche bei Konstrukt 5 ohne Ubiquitin aufgrund der GFP-Stabilität nicht erfolgt war. Die

Stabilität des Reporterproteins GFP konnte also durch N-terminale Fusion von Ubiquitin aufgehoben werden.

Betrachtet man die beiden Konstrukte 1 und 3 ohne GFP, so fällt auf, daß das Ubiquitin nicht abgespalten wurde (Abb.17). Offenbar stellt das kurze, artifizielle und wahrscheinlich ungefaltete MUC1-Polypeptid in Fusion mit Ubiquitin kein Substrat eines DUBs in der Zelle dar. Es ist bislang keine spezifische DUB-Erkennungssequenz in einem Substrat bekannt, aber die vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, daß ein solches Motiv beim Fusionspartner des Ubiquitins vorliegen muß. Bei den GFP-Konstrukten hatte die Ubiquitinabspaltung erwartungsgemäß stattgefunden (Abb.18). Um zu prüfen, welcher Mechanismus für diese unterschiedlichen Effekte verantwortlich ist, könnte man die Sequenzen von GFP und 4xMUC1<sub>950-958</sub> vertauschen. Die Sequenz für das Polypeptid sollte in diesem Fall direkt an die Ubiquitinsequenz anschließen. Wären die so gestalteten Konstrukte wieder DUB-resistent, ließe diese Beobachtung Rückschlüsse auf das Fehlen einer DUB-Erkennungssequenz im Polypeptid zu.

Da bei den Konstrukten 1 und 3 ohne GFP keine Ubiquitinabspaltung stattgefunden hatte, konnte die Aminosäure Arginin in Konstrukt 3 ihre destabilisierende Wirkung am N-Terminus nicht ausüben. Daher wurden beide Konstrukte etwa gleich stark degradiert. Es stellt sich die Frage, ob das stabil fusionierte Ubiquitin in diesen Fällen als Anker für eine Polyubiquitinierung gedient und dadurch den Abbau der Konstrukte herbeigeführt hatte. Im Immunoblot waren keine polyubiquitinierten Komplexe detektiert worden. Es besteht daher die Möglichkeit, daß die monoubiquitinierten Substrate vom 19S gebunden und inklusive des Ubiquitinanteils dem Abbau zugeführt wurden. Diese Annahme wäre durch eine K48-Mutation im Ubiquitin zu überprüfen, welche das Anheften einer Ubiquitinkette verhindert. Erweist sich das Konstrukt trotz der Mutation als instabil, so ist dies ein Hinweis darauf, daß das kurze monoubiquitinierte Polypeptid dem proteasomalen Abbau in der Zelle unterliegt.

#### 4.2.3 Konstrukt 2 – der UFD-Signalweg

Neben der zuvor erwähnten Verwendung der Aminosäure Prolin im Anschluß an die Ubiquitinsequenz wurde ein weiterer Mechanismus identifiziert, der die Deubiquitinierung eines linearen Fusionsproteins beeinträchtigt. Die Mutation des C-terminalen Glycins G76 zu Alanin (Butt *et al.* 1988) oder Valin (Johnson *et al.* 1992) führt zu einer Inhibition der Deubiquitinierung, gefolgt von einer schnellen Ubiquitin-abhängigen Degradation der Fusionskonstrukte. Dieser sogenannte *ubiquitin fusion degradation* (UFD) Signalweg wurde als erstes in *S.cerevisiae* anhand der Modelle UbG76-P- $\beta$ -Gal und UbV76- $\beta$ -Gal beschrieben (Johnson *et al.* 1995). Das N-terminal stabil fusionierte Ubiquitin stellt ein Degradationssignal dar, indem es einerseits als Erkennungsmotiv dient und andererseits durch seinen Lysinrest K48 einen Akzeptor für die Polyubiquitinierung bereitstellt. Verschiedene

Vakzinierungsstudien machten sich diesen Mechanismus zunutze, kamen jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich seiner Effizienz. Einige Publikationen stellen nur einen Vergleich zwischen einem Substrat X und seiner ubiquitinierten Version UbA76-X an. Während zum Beispiel Rodriguez *et al.* einen verbesserten Substratabbau beschrieben, gefolgt von verbesserter MHC Klasse I-Präsentation, CTL-Induktion und viraler Protektion (Rodriguez *et al.* 1998), konnten Ye *et al.* im Immunoblot und nach Plasmid-Immunisierung keine Unterschiede feststellen (Ye *et al.* 2002).

Für die vorliegende Arbeit wurden zwei Plasmide mit der beschriebenen G76A-Mutation kloniert, eines mit und eines ohne die GFP-Sequenz (Abb.13; siehe auch Klappentext). Beide Konstrukte erwiesen sich als vergleichsweise stabil, und ihre Anreicherung unter MG132-Behandlung war in beiden Fällen nur schwach ausgeprägt (Abb.17, 18). Die proteasomale Degradation dieser Konstrukte war daher offenbar ineffizient. Beim Konstrukt ohne GFP (UbA76-4xMUC1<sub>950-958</sub>) fand keine Abspaltung des Ubiquitins statt (Abb.17). Dieselbe Beobachtung wurde jedoch auch bei den UbG76-Konstrukten 1 und 3 gemacht und kann daher nicht auf die mangelhafte Spaltung nach der Aminosäure Alanin zurückgeführt werden. Vielmehr scheint wie zuvor erwähnt das kurze Polypeptid kein DUB-Substrat darzustellen. Wenn jedoch bei den drei Konstrukten 1, 2 und 3 das N-terminale Ubiquitin stets erhalten bleibt, warum werden dann nicht alle drei Konstrukte gleich effizient proteasomal degradiert? Die Antwort auf diese Frage muß in der G76A-Mutation begründet liegen, dem einzigen Unterschied zwischen den Konstrukten 1 und 3 im Vergleich zu 2. Möglicherweise dient das C-terminale Glycin als Erkennungssignal zur Bindung des Ubiquitins an 19S, gefolgt vom Abbau der Fusionskonstrukte. Diese Bindung kann durch die G76A-Mutation in ihrer Effizienz beeinträchtigt sein, so daß die 26S proteasomale Degradation negativ beeinflusst wird. Eine ähnliche Beobachtung wurde von Guterman und Glickman publiziert, die anhand von N-terminal monoubiquitiniertem GFP zeigen konnten, daß *in vitro* die Deubiquitinierungsaktivität des 26S Proteasoms durch eine G76V-Mutation stark beeinträchtigt ist (Guterman and Glickman 2004).

Betrachtet man das Konstrukt 2 mit GFP (UbA76-GFP-4xMUC1<sub>950-958</sub>), so fällt zunächst auf, daß trotz der G76A-Mutation eine fast vollständige Abspaltung von Ubiquitin stattgefunden hatte (Abb.18). Ähnliche Beobachtungen machten auch Delogu *et al.* und Tellam *et al.* in ihren zuvor erwähnten Arbeiten (Delogu *et al.* 2000; Tellam *et al.* 2001). Es müssen daher in der Zelle DUBs existieren, die ungeachtet dieser Mutation in der Lage sind, das N-terminale Ubiquitin abzuspalten. Es ist nicht geklärt, ob diese Abspaltung nach G75 oder nach A76 erfolgt und entsprechend am N-Terminus des Fusionsproteins ein Alanin- oder ein Glycinrest generiert wird. Beiden Aminosäuren wird gemäß der N-End-Regel ein stabilisierender Charakter zugeschrieben, und das Konstrukt zeichnet sich entsprechend durch seine Stabilität aus. Es bleibt die Frage, warum sich trotz der Abspaltung des N-terminalen Ubiquitins die Konstrukte 1 und 2 unterschiedlich verhalten. Eine Erklärung hierfür könnte -wie bereits für

die Konstrukte ohne GFP beschrieben- in der schlechteren Bindung von UbA76 an den 19S Regulator liegen. Möglicherweise erfolgt die Bindung der UbG76-Konstrukte an 19S, gefolgt von Deubiquitinierung und Degradation, während der Mechanismus der Bindung von UbA76 an 19S verhindert ist und somit auch kein Abbau erfolgen kann. Trotzdem liegen in der Zelle eventuell andere DUBs vor, die ungeachtet der G76A-Mutation eine Ubiquitinabspaltung vornehmen und das GFP-Konstrukt als freies, stabiles Protein entlassen.

Der beschriebene UFD-Signalweg zur Degradation artifizieller Substrate scheint eine natürliche Entsprechung in der Zelle zu haben. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, daß die posttranslationale N-terminale Ubiquitinierung einen wichtigen physiologischen Prozeß zur Modifikation und Kennzeichnung proteasomaler Substrate darstellt. Die erste Beschreibung dieses Mechanismus erfolgte anhand des Transkriptionsfaktors MyoD, der durch die Mutation seiner neun internen Lysinreste nicht signifikant in seiner Stabilität beeinflusst wurde. Sein Abbau erfolgte trotzdem in Abhängigkeit des Ubiquitin / Proteasomensystems, da der Einsatz von Proteasomeninhibitoren zur Anreicherung ubiquitinierten MyoD-Mutanten führte. Durch die N-terminale Fusion eines Myc-Tags an MyoD ebenso wie durch die Verkürzung seines N-Terminus konnte das Protein schließlich *in vitro* und *in vivo* stabilisiert werden (Breitschopf *et al.* 1998). Die Degradation von MyoD scheint daher von seiner N-terminalen Ubiquitinierung abzuhängen, deren Erkennungssignal durch eine N-terminale Modifikation in seiner Funktion beeinträchtigt werden konnte. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Untersuchungen an fünf weiteren Proteinen, die offenbar den Weg der N-terminalen Ubiquitinierung durchlaufen: das HPV16 Onkoprotein E7 (Reinstein *et al.* 2000), die EBV *latent membrane proteins* LMP1 (Aviel *et al.* 2000) und LMP2A (Ikeda *et al.* 2002), der CDK-Inhibitor p21 (Bloom *et al.* 2003) sowie der Entwicklungsregulator Id2 (Fajerman *et al.* 2004). Da zwischen den N-terminalen Domänen dieser Proteine keine Homologien bestehen, muß davon ausgegangen werden, daß sie -im Falle ihrer Funktion als Erkennungsmotive- von verschiedenen Komponenten des Ubiquitin / Proteasomensystems erkannt werden. Natürlich vorkommende Proteine ohne internes Lysin müssen diesen Weg des proteasomalen Abbaus beschreiten. Viele solcher Proteine, insbesondere viraler Herkunft, können in Datenbanken gefunden werden.

#### 4.2.4 Konstrukt 4 – C-terminale Ubiquitininfusion

Welche Folgen hat die Ubiquitininfusion an anderen Positionen als dem N-Terminus eines Substrats? Fusionsproteine mit C-terminalem Ubiquitin (X-Ub) wurden zum Nachweis Proteasomen-unabhängiger Rollen von Monoubiquitin z.B. bei Proteintransport und viraler Knospung verwendet (Patnaik *et al.* 2000; Terrell *et al.* 1998). Diese und andere Untersuchungen bedienten sich jedoch einer Ub-K48-Mutante, um Polyubiquitinierung und Degradation des Fusionskonstrukts zu vermeiden. Da rekombinantes Ubiquitin mit kurzen N-terminalen Anhängen (His<sub>6</sub>-Ub, Myc-Ub) in Konjugationsreaktionen *in vitro* das Wildtyp-

Ubiquitin ersetzen kann (Beers and Callis 1993; Ellison and Hochstrasser 1991), wurde in der Regel davon ausgegangen, daß X-Ub Fusionsproteine dem UFD-Signalweg und der proteasomalen Degradation unterworfen sind. So konnte in einer Vakzinierungsstudie mit Plasmid-DNA gezeigt werden, daß die C-terminale Fusion von Ubiquitin an eine Polyepitop-Sequenz zur Abstoßung eines etablierten Tumors im Mausmodell führte und von einer starken CTL-Induktion begleitet war (Velders *et al.* 2001).

Um der Frage nach dem Effekt von C-terminal fusioniertem Ubiquitin auf die Stabilität des hier verwendeten (GFP-) Polyepitops genauer nachzugehen, wurden zwei Polyepitop-Plasmide mit und ohne GFP-Sequenz kloniert (Abb.13; siehe auch Klappentext). Das Konstrukt ohne GFP (4xMUC1<sub>950-958</sub>-UbG76) zeigte unter MG132-Behandlung eine leichte Anreicherung, die ein Hinweis auf seine proteasomale -wenn auch nicht besonders effiziente- Degradation ist. Andererseits wurde auch eine Anreicherung hochmolekularer Komplexe gefunden (Abb.17), deren Charakter zunächst unklar war.

Das Konstrukt mit der GFP-Sequenz (4xMUC1<sub>950-958</sub>-GFP-UbG76) zeichnete sich durch seine besondere Stabilität aus. Statt einer Anreicherung der Konstrukte nach MG132-Behandlung konnte sogar eine leichte Abnahme des Fusionsproteins beobachtet werden. Diese Resultate weisen darauf hin, daß C-terminal fusioniertes Ubiquitin im Fall von GFP als Fusionspartner kein Degradationssignal darstellt. Stattdessen wurden im Immunoblot in Analogie zu den zuvor beschriebenen Beobachtungen hochmolekulare Komplexe detektiert (Abb.18). Diese könnten ein Hinweis darauf sein, daß das stabile Fusionskonstrukt posttranslational an verschiedene cytosolische Proteine gebunden wurde. Diese Konjugation könnte ähnlich wie die des Wildtyp-Ubiquitins über das C-terminale Glycin erfolgt sein. Zwei Indizien sprechen für diese Vermutung: Erstens wurde eine Anreicherung der hochmolekularen Komplexe unter MG132-Behandlung beobachtet, besonders ausgeprägt im Konstrukt ohne GFP. Zweitens erfolgte -im Falle des Konstrukts mit GFP- gleichzeitig eine Abnahme der Fusionsproteine. Dieses Verhalten ist identisch mit dem von freiem Ubiquitin bei proteasomaler Inhibition (Schubert *et al.* 2000).

Während die vorliegende Arbeit angefertigt wurde, veröffentlichte die Gruppe von J.Yewdell eine ähnliche Untersuchung zum Schicksal C-terminaler Ubiquitin-Fusionsproteine (Qian *et al.* 2002). Die Daten dieser Publikation bestätigen und erweitern die hier vorgestellten Ergebnisse. Insbesondere konnte gezeigt werden, daß durch eine G76V-Mutation am Ubiquitin das Auftreten hochmolekularer Komplexe unterbunden wurde. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf die Funktion des C-terminalen Glycins bei der Konjugationsreaktion. Eine K48R-Mutation hingegen konnte die Entstehung hochmolekularer Komplexe nicht beeinträchtigen, was demonstriert, daß die Ubiquitin-Fusionskonstrukte einen Kettenabbruch verursachen.

#### **4.2.5 Ausblick: Aspekte der N-terminalen Monoubiquitininfusion beim proteasomalen Substratabbau**

Die Modifikation eines Proteins durch Monoubiquitin war bislang als lysosomaler Degradationsmarker sowie im Zusammenhang mit nicht-proteolytischen Funktionen wie Histonregulation und viraler Knospung bekannt (Di Fiore *et al.* 2003; Hicke 2001). Im Gegensatz dazu fördert die Polyubiquitinierung den Substratabbau durch das 26S Proteasom, scheint jedoch keine unerläßliche Voraussetzung hierfür zu sein (Hershko and Heller 1985). Es konnte gezeigt werden, daß die Monoubiquitinierung einschließlich der linearen Ubiquitininfusion für den Abbau bestimmter Substrate durch das 26S Proteasom ausreicht (Eytan *et al.* 1993; Haas *et al.* 1990; Shaeffer and Kania 1995).

Die vorliegenden Untersuchungen weisen darauf hin, daß in Abhängigkeit des gewählten Substrats der Einsatz von N-terminal fusioniertem Ubiquitin verschiedene Auswirkungen auf das Schicksal des Fusionskonstrukts in der Zelle haben kann. Das kurze und wahrscheinlich ungefaltete MUC1-Polypeptid unterliegt keiner Deubiquitinierung. Eine Polyubiquitinierung konnte ebensowenig nachgewiesen werden. Stattdessen weisen die experimentellen Daten darauf hin, daß das intakte Fusionskonstrukt proteasomal abgebaut wird. Dieser Vorgang wird durch eine G76A-Mutation am Ubiquitin gehemmt, welche möglicherweise die Bindung des Konstrukts an den 19S Regulator beeinträchtigt. Es ist daher denkbar, daß eine effiziente Bindung des Monoubiquitin-fusionierten Polypeptids an den 19S Regulator ausreichend für die proteasomale Degradation ist.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete GFP ähnelt vermutlich natürlichen Substraten in seiner Eigenschaft als stabiles, gefaltetes Protein, welches ohne die Verknüpfung mit Ubiquitin nicht proteasomal degradiert wird. GFP kann *in vitro* durch eine einzige N-terminal fusionierte Ubiquitinuntereinheit vom 26S Proteasom abgebaut werden (Guterman and Glickman 2004). Hierbei wurde jedoch ein konkurrierender Mechanismus zwischen Deubiquitinierung und Degradation beschrieben, während die Daten der vorliegenden Arbeit darauf hinweisen, daß die Deubiquitinierung der Degradation vorausgeht. Die wichtige Bedeutung, die der Bindung eines ubiquitinierten Substrats an den 19S Regulator zukommt, könnte einige Unterschiede zwischen den hier vorgestellten Ergebnissen und anderen Untersuchungen bedingen. Die Erkennung und Bindung eines polyubiquitinierten Substrats (Verma *et al.* 2002) oder eines monoubiquitinierten, ungefalteten Substrats (Yao and Cohen 2002) verhält sich unterschiedlich zum hier vorgestellten monoubiquitinierten GFP.

Die Verwendung einer N-terminalen Ubiquitininfusion kann unter geeigneten Umständen den 26S proteasomalen Abbau eines Substrats stark begünstigen. Hierbei scheint ungeachtet des Fusionspartners die G76A-Mutation des Ubiquitins einen nachteiligen Einfluß auf die Prozessierung auszuüben. Die genauen Mechanismen der Degradation Monoubiquitin-

---

fusionierter Substrate sind noch nicht hinlänglich aufgeklärt. Bei kurzen, ungefalteten Substraten wie dem hier verwendeten MUC1-Polyepitop ist es denkbar, daß auch ohne Ubiquitininfusion ein proteasomaler Abbau stattfindet. Dieser könnte durch das zelluläre freie 20S Proteasom erfolgen und die gewünschte Epitopgenerierung mit sich bringen.

## 5 LITERATUR

- Amerik, A. Y.; Li, S. J. and Hochstrasser, M. (2000): Analysis of the deubiquitinating enzymes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biol Chem* 381 [9-10], 981-92.
- Andre, P.; Groettrup, M.; Klennerman, P.; de Giuli, R.; Booth, B. L., Jr.; Cerundolo, V.; Bonneville, M.; Jotereau, F.; Zinkernagel, R. M. and Lotteau, V. (1998): An inhibitor of HIV-1 protease modulates proteasome activity, antigen presentation, and T cell responses, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [22], 13120-4.
- Apcher, G. S.; Heink, S.; Zantopf, D.; Kloetzel, P. M.; Schmid, H. P.; Mayer, R. J. and Kruger, E. (2003): Human immunodeficiency virus-1 Tat protein interacts with distinct proteasomal alpha and beta subunits, *FEBS Lett* 553 [1-2], 200-4.
- Apostolopoulos, V.; Karanikas, V.; Haurum, J. S. and McKenzie, I. F. (1997): Induction of HLA-A2-restricted CTLs to the mucin 1 human breast cancer antigen, *J Immunol* 159 [11], 5211-8.
- Arnason, T. and Ellison, M. J. (1994): Stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* is strongly correlated with assembly of a novel type of multiubiquitin chain, *Mol Cell Biol* 14 [12], 7876-83.
- Arnold, B. and Hammerling, G. J. (1991): MHC class-I transgenic mice, *Annu Rev Immunol* 9, 297-322.
- Aviel, S.; Winberg, G.; Massucci, M. and Ciechanover, A. (2000): Degradation of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) by the ubiquitin-proteasome pathway. Targeting via ubiquitination of the N-terminal residue, *J Biol Chem* 275 [31], 23491-9.
- Ayyoub, M.; Migliaccio, M.; Guillaume, P.; Lienard, D.; Cerottini, J. C.; Romero, P.; Levy, F.; Speiser, D. E. and Valmori, D. (2001): Lack of tumor recognition by hTERT peptide 540-548-specific CD8(+) T cells from melanoma patients reveals inefficient antigen processing, *Eur J Immunol* 31 [9], 2642-51.
- Bachmair, A.; Finley, D. and Varshavsky, A. (1986): In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue, *Science* 234 [4773], 179-86.
- Bachmair, A. and Varshavsky, A. (1989): The degradation signal in a short-lived protein, *Cell* 56 [6], 1019-32.
- Bahloul, C.; Jacob, Y.; Tordo, N. and Perrin, P. (1998): DNA-based immunization for exploring the enlargement of immunological cross-reactivity against the lyssaviruses, *Vaccine* 16 [4], 417-25.
- Baker, R. T.; Tobias, J. W. and Varshavsky, A. (1992): Ubiquitin-specific proteases of *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning of UBP2 and UBP3, and functional analysis of the UBP gene family, *J Biol Chem* 267 [32], 23364-75.
- Bao, J.; Sato, K.; Li, M.; Gao, Y.; Abid, R.; Aird, W.; Simons, M. and Post, M. J. (2001): PR-39 and PR-11 peptides inhibit ischemia-reperfusion injury by blocking proteasome-mediated I kappa B alpha degradation, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281 [6], H2612-8.
- Barra, C.; Perarnau, B.; Gerlinger, P.; Lemeur, M.; Gillet, A.; Gibier, P. and Lemonnier, F. A. (1989): Analysis of the HLA-Cw3-specific cytotoxic T lymphocyte response of HLA-B7 X human beta 2m double transgenic mice, *J Immunol* 143 [10], 3117-24.
- Baumeister, W.; Walz, J.; Zuhl, F. and Seemuller, E. (1998): The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease, *Cell* 92 [3], 367-80.
- Beekman, N. J.; van Veelen, P. A.; van Hall, T.; Neisig, A.; Sijts, A.; Camps, M.; Kloetzel, P. M.; Neefjes, J. J.; Melief, C. J. and Ossendorp, F. (2000): Abrogation of CTL epitope processing by single amino acid substitution flanking the C-terminal proteasome cleavage site, *J Immunol* 164 [4], 1898-905.
- Beers, E. P. and Callis, J. (1993): Utility of polyhistidine-tagged ubiquitin in the purification of ubiquitin-protein conjugates and as an affinity ligand for the purification of ubiquitin-specific hydrolases, *J Biol Chem* 268 [29], 21645-9.
- Bellanger, S.; Demeret, C.; Goyat, S. and Thierry, F. (2001): Stability of the human papillomavirus type 18 E2 protein is regulated by a proteasome degradation pathway through its amino-terminal transactivation domain, *J Virol* 75 [16], 7244-51.
- Benham, A. M.; Gromme, M. and Neefjes, J. (1998): Allelic differences in the relationship between proteasome activity and MHC class I peptide loading, *J Immunol* 161 [1], 83-9.
- Bevan, M. J. (1976): Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay, *J Exp Med* 143 [5], 1283-8.
- Bloom, J.; Amador, V.; Bartolini, F.; DeMartino, G. and Pagano, M. (2003): Proteasome-mediated degradation of p21 via N-terminal ubiquitinylation, *Cell* 115 [1], 71-82.
- Bocchia, M.; Bronte, V.; Colombo, M. P.; De Vincentiis, A.; Di Nicola, M.; Forni, G.; Lanata, L.; Lemoli, R. M.; Massaia, M.; Rondelli, D.; Zanon, P. and Tura, S. (2000): Antitumor vaccination: where we stand, *Haematologica* 85 [11], 1172-206.
- Boes, B.; Hengel, H.; Ruppert, T.; Multhaupt, G.; Koszinowski, U. H. and Kloetzel, P. M. (1994): Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes, *J Exp Med* 179 [3], 901-9.
- Borodovsky, A.; Kessler, B. M.; Casagrande, R.; Overkleeft, H. S.; Wilkinson, K. D. and Ploegh, H. L. (2001): A novel active site-directed probe specific for deubiquitylating enzymes reveals proteasome association of USP14, *Embo J* 20 [18], 5187-96.



- Bose, S.; Stratford, F. L.; Broadfoot, K. I.; Mason, G. G. and Rivett, A. J. (2004): Phosphorylation of 20S proteasome alpha subunit C8 (alpha7) stabilizes the 26S proteasome and plays a role in the regulation of proteasome complexes by gamma-interferon, *Biochem J* 378 [Pt 1], 177-84.
- Braun, B. C.; Glickman, M.; Kraft, R.; Dahlmann, B.; Kloetzel, P. M.; Finley, D. and Schmidt, M. (1999): The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity, *Nat Cell Biol* 1 [4], 221-6.
- Breitschopf, K.; Bengal, E.; Ziv, T.; Admon, A. and Ciechanover, A. (1998): A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein, *Embo J* 17 [20], 5964-73.
- Brossart, P.; Heinrich, K. S.; Stuhler, G.; Behnke, L.; Reichardt, V. L.; Stevanovic, S.; Muhm, A.; Rammensee, H. G.; Kanz, L. and Brugger, W. (1999): Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies, *Blood* 93 [12], 4309-17.
- Butt, T. R.; Khan, M. I.; Marsh, J.; Ecker, D. J. and Crooke, S. T. (1988): Ubiquitin-metallothionein fusion protein expression in yeast. A genetic approach for analysis of ubiquitin functions, *J Biol Chem* 263 [31], 16364-71.
- Casares, S.; Inaba, K.; Brumeanu, T. D.; Steinman, R. M. and Bona, C. A. (1997): Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope, *J Exp Med* 186 [9], 1481-6.
- Cascio, P.; Hilton, C.; Kisselev, A. F.; Rock, K. L. and Goldberg, A. L. (2001): 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide, *Embo J* 20 [10], 2357-66.
- Cerundolo, V.; Benham, A.; Braud, V.; Mukherjee, S.; Gould, K.; Macino, B.; Neefjes, J. and Townsend, A. (1997): The proteasome-specific inhibitor lactacystin blocks presentation of cytotoxic T lymphocyte epitopes in human and murine cells, *Eur J Immunol* 27 [1], 336-41.
- Chau, V.; Tobias, J. W.; Bachmair, A.; Marriott, D.; Ecker, D. J.; Gonda, D. K. and Varshavsky, A. (1989): A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein, *Science* 243 [4898], 1576-83.
- Chernova, T. A.; Allen, K. D.; Wesoloski, L. M.; Shanks, J. R.; Chernoff, Y. O. and Wilkinson, K. D. (2003): Pleiotropic effects of Ubp6 loss on drug sensitivities and yeast prion are due to depletion of the free ubiquitin pool, *J Biol Chem* 278 [52], 52102-15.
- Choppin, J.; Cohen, W.; Bianco, A.; Briand, J. P.; Connan, F.; Dalod, M. and Guillet, J. G. (2001): Characteristics of HIV-1 Nef regions containing multiple CD8+ T cell epitopes: wealth of HLA-binding motifs and sensitivity to proteasome degradation, *J Immunol* 166 [10], 6164-9.
- Ciechanover, A. (1998): The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life, *Embo J* 17 [24], 7151-60.
- Ciechanover, A. and Schwartz, A. L. (2002): Ubiquitin-mediated degradation of cellular proteins in health and disease, *Hepatology* 35 [1], 3-6.
- Condon, C.; Watkins, S. C.; Celluzzi, C. M.; Thompson, K. and Falo, L. D., Jr. (1996): DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells, *Nat Med* 2 [10], 1122-8.
- Corr, M.; Lee, D. J.; Carson, D. A. and Tighe, H. (1996): Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming, *J Exp Med* 184 [4], 1555-60.
- Corr, M.; von Damm, A.; Lee, D. J. and Tighe, H. (1999): In vivo priming by DNA injection occurs predominantly by antigen transfer, *J Immunol* 163 [9], 4721-7.
- Craiu, A.; Gaczynska, M.; Akopian, T.; Gramm, C. F.; Fenteany, G.; Goldberg, A. L. and Rock, K. L. (1997): Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple proteasome beta-subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation, *J Biol Chem* 272 [20], 13437-45.
- Dahl, A. M.; Beverley, P. C. and Stauss, H. J. (1996): A synthetic peptide derived from the tumor-associated protein mdm2 can stimulate autoreactive, high avidity cytotoxic T lymphocytes that recognize naturally processed protein, *J Immunol* 157 [1], 239-46.
- Davis, H. L. (2000): Use of CpG DNA for enhancing specific immune responses, *Curr Top Microbiol Immunol* 247, 171-83.
- Delogu, G.; Howard, A.; Collins, F. M. and Morris, S. L. (2000): DNA vaccination against tuberculosis: expression of a ubiquitin-conjugated tuberculosis protein enhances antimycobacterial immunity, *Infect Immun* 68 [6], 3097-102.
- Deveraux, Q.; Ustrell, V.; Pickart, C. and Rechsteiner, M. (1994): A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates, *J Biol Chem* 269 [10], 7059-61.
- Di Fiore, P. P.; Polo, S. and Hofmann, K. (2003): When ubiquitin meets ubiquitin receptors: a signalling connection, *Nat Rev Mol Cell Biol* 4 [6], 491-7.
- Doe, B.; Selby, M.; Barnett, S.; Baenziger, J. and Walker, C. M. (1996): Induction of cytotoxic T lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow-derived cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 [16], 8578-83.

- Domenech, N.; Henderson, R. A. and Finn, O. J. (1995): Identification of an HLA-A11-restricted epitope from the tandem repeat domain of the epithelial tumor antigen mucin, *J Immunol* 155 [10], 4766-74.
- Dubiel, W.; Pratt, G.; Ferrell, K. and Rechsteiner, M. (1992): Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease, *J Biol Chem* 267 [31], 22369-77.
- Ecker, D. J.; Stadel, J. M.; Butt, T. R.; Marsh, J. A.; Monia, B. P.; Powers, D. A.; Gorman, J. A.; Clark, P. E.; Warren, F.; Shatzman, A. and et al. (1989): Increasing gene expression in yeast by fusion to ubiquitin, *J Biol Chem* 264 [13], 7715-9.
- Eggers, M.; Boes-Fabian, B.; Ruppert, T.; Kloetzel, P. M. and Koszinowski, U. H. (1995): The cleavage preference of the proteasome governs the yield of antigenic peptides, *J Exp Med* 182 [6], 1865-70.
- Ellison, M. J. and Hochstrasser, M. (1991): Epitope-tagged ubiquitin. A new probe for analyzing ubiquitin function, *J Biol Chem* 266 [31], 21150-7.
- Emmerich, N. P.; Nussbaum, A. K.; Stevanovic, S.; Priemer, M.; Toes, R. E.; Rammensee, H. G. and Schild, H. (2000): The human 26 S and 20 S proteasomes generate overlapping but different sets of peptide fragments from a model protein substrate, *J Biol Chem* 275 [28], 21140-8.
- Engelhard, V. H.; Lacy, E. and Ridge, J. P. (1991): Influenza A-specific, HLA-A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes from HLA-A2.1 transgenic mice recognize fragments of the M1 protein, *J Immunol* 146 [4], 1226-32.
- Eytan, E.; Armon, T.; Heller, H.; Beck, S. and Hershko, A. (1993): Ubiquitin C-terminal hydrolase activity associated with the 26 S protease complex, *J Biol Chem* 268 [7], 4668-74.
- Fairchild, P. J. and Wraith, D. C. (1996): Lowering the tone: mechanisms of immunodominance among epitopes with low affinity for MHC, *Immunol Today* 17 [2], 80-85.
- Fajerman, I.; Schwartz, A. L. and Ciechanover, A. (2004): Degradation of the Id2 developmental regulator: targeting via N-terminal ubiquitination, *Biochem Biophys Res Commun* 314 [2], 505-12.
- Feizi, T.; Gooi, H. C.; Childs, R. A.; Picard, J. K.; Uemura, K.; Loomes, L. M.; Thorpe, S. J. and Hounsell, E. F. (1984): Tumour-associated and differentiation antigens on the carbohydrate moieties of mucin-type glycoproteins, *Biochem Soc Trans* 12 [4], 591-6.
- Finley, D.; Bartel, B. and Varshavsky, A. (1989): The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis, *Nature* 338 [6214], 394-401.
- Finley, D.; Ozkaynak, E. and Varshavsky, A. (1987): The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses, *Cell* 48 [6], 1035-46.
- Firat, H.; Cochet, M.; Rohrlisch, P. S.; Garcia-Pons, F.; Darce, S.; Danos, O.; Lemonnier, F. A. and Langlade-Demoyen, P. (2002): Comparative analysis of the CD8(+) T cell repertoires of H-2 class I wild-type/HLA-A2.1 and H-2 class I knockout/HLA-A2.1 transgenic mice, *Int Immunol* 14 [8], 925-34.
- Firat, H.; Garcia-Pons, F.; Tourdot, S.; Pascolo, S.; Scardino, A.; Garcia, Z.; Michel, M. L.; Jack, R. W.; Jung, G.; Kosmatopoulos, K.; Mateo, L.; Suhrbier, A.; Lemonnier, F. A. and Langlade-Demoyen, P. (1999): H-2 class I knockout, HLA-A2.1-transgenic mice: a versatile animal model for preclinical evaluation of antitumor immunotherapeutic strategies, *Eur J Immunol* 29 [10], 3112-21.
- Firat, H.; Tourdot, S.; Ureta-Vidal, A.; Scardino, A.; Suhrbier, A.; Buseyne, F.; Riviere, Y.; Danos, O.; Michel, M. L.; Kosmatopoulos, K. and Lemonnier, F. A. (2001): Design of a polyepitope construct for the induction of HLA-A0201-restricted HIV 1-specific CTL responses using HLA-A\*0201 transgenic, H-2 class I KO mice, *Eur J Immunol* 31 [10], 3064-74.
- Frentzel, S.; Pesold-Hurt, B.; Seelig, A. and Kloetzel, P. M. (1994): 20 S proteasomes are assembled via distinct precursor complexes. Processing of LMP2 and LMP7 proproteins takes place in 13-16 S preproteasome complexes, *J Mol Biol* 236 [4], 975-81.
- Fu, T. M.; Ulmer, J. B.; Caulfield, M. J.; Deck, R. R.; Friedman, A.; Wang, S.; Liu, X.; Donnelly, J. J. and Liu, M. A. (1997): Priming of cytotoxic T lymphocytes by DNA vaccines: requirement for professional antigen presenting cells and evidence for antigen transfer from myocytes, *Mol Med* 3 [6], 362-71.
- Fung, P. Y. and Longenecker, B. M. (1991): Specific immunosuppressive activity of epiglycanin, a mucin-like glycoprotein secreted by a murine mammary adenocarcinoma (TA3-HA), *Cancer Res* 51 [4], 1170-6.
- Gaczynska, M.; Osmulski, P. A.; Gao, Y.; Post, M. J. and Simons, M. (2003): Proline- and arginine-rich peptides constitute a novel class of allosteric inhibitors of proteasome activity, *Biochemistry* 42 [29], 8663-70.
- Gaczynska, M.; Rock, K. L. and Goldberg, A. L. (1993): Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes, *Nature* 365 [6443], 264-7.
- Gaczynska, M.; Rock, K. L.; Spies, T. and Goldberg, A. L. (1994): Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 [20], 9213-7.
- Gaedicke, S.; Firat-Geier, E.; Constantiniu, O.; Lucchiari-Hartz, M.; Freudenberg, M.; Galanos, C. and Niedermann, G. (2002): Antitumor effect of the human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir: induction of tumor-cell apoptosis associated with perturbation of proteasomal proteolysis, *Cancer Res* 62 [23], 6901-8.

- Gao, Y.; Lecker, S.; Post, M. J.; Hietaranta, A. J.; Li, J.; Volk, R.; Li, M.; Sato, K.; Saluja, A. K.; Steer, M. L.; Goldberg, A. L. and Simons, M. (2000): Inhibition of ubiquitin-proteasome pathway-mediated I kappa B alpha degradation by a naturally occurring antibacterial peptide, *J Clin Invest* 106 [3], 439-48.
- Geier, E.; Pfeifer, G.; Wilm, M.; Lucchiarri-Hartz, M.; Baumeister, W.; Eichmann, K. and Niedermann, G. (1999): A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome, *Science* 283 [5404], 978-81.
- Gendler, S. J.; Lancaster, C. A.; Taylor-Papadimitriou, J.; Duhig, T.; Peat, N.; Burchell, J.; Pemberton, L.; Lalani, E. N. and Wilson, D. (1990): Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin, *J Biol Chem* 265 [25], 15286-93.
- Gileadi, U.; Moins-Teisserenc, H. T.; Correa, I.; Booth, B. L., Jr.; Dunbar, P. R.; Sewell, A. K.; Trowsdale, J.; Phillips, R. E. and Cerundolo, V. (1999): Generation of an immunodominant CTL epitope is affected by proteasome subunit composition and stability of the antigenic protein, *J Immunol* 163 [11], 6045-52.
- Glickman, M. H. and Ciechanover, A. (2002): The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction, *Physiol Rev* 82 [2], 373-428.
- Goldberg, A. L.; Cascio, P.; Saric, T. and Rock, K. L. (2002): The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides, *Mol Immunol* 39 [3-4], 147-64.
- Goldberg, A. L. and Rock, K. L. (1992): Proteolysis, proteasomes and antigen presentation, *Nature* 357 [6377], 375-9.
- Goldknopf, I. L. and Busch, H. (1977): Isopeptide linkage between nonhistone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugate-protein A24, *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 [3], 864-8.
- Gonda, D. K.; Bachmair, A.; Wunning, I.; Tobias, J. W.; Lane, W. S. and Varshavsky, A. (1989): Universality and structure of the N-end rule, *J Biol Chem* 264 [28], 16700-12.
- Graham, R. A.; Burchell, J. M.; Beverley, P. and Taylor-Papadimitriou, J. (1996): Intramuscular immunisation with MUC1 cDNA can protect C57 mice challenged with MUC1-expressing syngeneic mouse tumour cells, *Int J Cancer* 65 [5], 664-70.
- Graham, R. A.; Burchell, J. M. and Taylor-Papadimitriou, J. (1996): The polymorphic epithelial mucin: potential as an immunogen for a cancer vaccine, *Cancer Immunol Immunother* 42 [2], 71-80.
- Greenberg, R. A.; Chin, L.; Femino, A.; Lee, K. H.; Gottlieb, G. J.; Singer, R. H.; Greider, C. W. and DePinho, R. A. (1999): Short dysfunctional telomeres impair tumorigenesis in the INK4a(delta2/3) cancer-prone mouse, *Cell* 97 [4], 515-25.
- Groettrup, M.; Soza, A.; Eggers, M.; Kuehn, L.; Dick, T. P.; Schild, H.; Rammensee, H. G.; Koszinowski, U. H. and Kloetzel, P. M. (1996): A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation, *Nature* 381 [6578], 166-8.
- Groll, M.; Bajorek, M.; Kohler, A.; Moroder, L.; Rubin, D. M.; Huber, R.; Glickman, M. H. and Finley, D. (2000): A gated channel into the proteasome core particle, *Nat Struct Biol* 7 [11], 1062-7.
- Groll, M.; Ditzel, L.; Lowe, J.; Stock, D.; Bochtler, M.; Bartunik, H. D. and Huber, R. (1997): Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution, *Nature* 386 [6624], 463-71.
- Gronroos, E.; Hellman, U.; Heldin, C. H. and Ericsson, J. (2002): Control of Smad7 stability by competition between acetylation and ubiquitination, *Mol Cell* 10 [3], 483-93.
- Guterman, A. and Glickman, M. H. (2004): Complementary roles for Rpn11 and Ubp6 in deubiquitination and proteolysis by the proteasome, *J Biol Chem* 279 [3], 1729-38.
- Guterman, A. and Glickman, M. H. (2004): Deubiquitinating enzymes are IN/(trinsic to proteasome function), *Curr Protein Pept Sci* 5 [3], 201-11.
- Haas, A.; Reback, P. M.; Pratt, G. and Rechsteiner, M. (1990): Ubiquitin-mediated degradation of histone H3 does not require the substrate-binding ubiquitin protein ligase, E3, or attachment of polyubiquitin chains, *J Biol Chem* 265 [35], 21664-9.
- Hahn, W. C.; Stewart, S. A.; Brooks, M. W.; York, S. G.; Eaton, E.; Kurachi, A.; Beijersbergen, R. L.; Knoll, J. H.; Meyerson, M. and Weinberg, R. A. (1999): Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells, *Nat Med* 5 [10], 1164-70.
- Hanna, J.; Leggett, D. S. and Finley, D. (2003): Ubiquitin depletion as a key mediator of toxicity by translational inhibitors, *Mol Cell Biol* 23 [24], 9251-61.
- Harding, C. V. and Song, R. (1994): Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules, *J Immunol* 153 [11], 4925-33.
- Herbert, B.; Pitts, A. E.; Baker, S. I.; Hamilton, S. E.; Wright, W. E.; Shay, J. W. and Corey, D. R. (1999): Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [25], 14276-81.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998): The ubiquitin system, *Annu Rev Biochem* 67, 425-79.
- Hershko, A. and Heller, H. (1985): Occurrence of a polyubiquitin structure in ubiquitin-protein conjugates, *Biochem Biophys Res Commun* 128 [3], 1079-86.
- Hicke, L. (2001): Protein regulation by monoubiquitin, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 [3], 195-201.
- Hilkens, J.; Ligtenberg, M. J.; Vos, H. L. and Litvinov, S. V. (1992): Cell membrane-associated mucins and their adhesion-modulating property, *Trends Biochem Sci* 17 [9], 359-63.

- Hochstrasser, M. (1995): Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation, *Curr Opin Cell Biol* 7 [2], 215-23.
- Hochstrasser, M. (1996): Protein degradation or regulation: Ub the judge, *Cell* 84 [6], 813-5.
- Holzhtutter, H. G.; Frommel, C. and Kloetzel, P. M. (1999): A theoretical approach towards the identification of cleavage-determining amino acid motifs of the 20 S proteasome, *J Mol Biol* 286 [4], 1251-65.
- Holz, H.; Kapelari, B.; Kellermann, J.; Seemuller, E.; Sumegi, M.; Udvardy, A.; Medalia, O.; Sperling, J.; Muller, S. A.; Engel, A. and Baumeister, W. (2000): The regulatory complex of *Drosophila melanogaster* 26S proteasomes. Subunit composition and localization of a deubiquitylating enzyme, *J Cell Biol* 150 [1], 119-30.
- Hou, D.; Cenciarelli, C.; Jensen, J. P.; Nguygen, H. B. and Weissman, A. M. (1994): Activation-dependent ubiquitination of a T cell antigen receptor subunit on multiple intracellular lysines, *J Biol Chem* 269 [19], 14244-7.
- Hu, Z.; Zhang, Z.; Doo, E.; Coux, O.; Goldberg, A. L. and Liang, T. J. (1999): Hepatitis B virus X protein is both a substrate and a potential inhibitor of the proteasome complex, *J Virol* 73 [9], 7231-40.
- Huang, X.; Seifert, U.; Salzmann, U.; Henklein, P.; Preissner, R.; Henke, W.; Sijts, A. J.; Kloetzel, P. M. and Dubiel, W. (2002): The RTP site shared by the HIV-1 Tat protein and the 11S regulator subunit alpha is crucial for their effects on proteasome function including antigen processing, *J Mol Biol* 323 [4], 771-82.
- Huibregtse, J. M.; Scheffner, M.; Beaudenon, S. and Howley, P. M. (1995): A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 [7], 2563-7.
- Ikeda, M.; Ikeda, A. and Longnecker, R. (2002): Lysine-independent ubiquitination of Epstein-Barr virus LMP2A, *Virology* 300 [1], 153-9.
- Iwasaki, A.; Dela Cruz, C. S.; Young, A. R. and Barber, B. H. (1999): Epitope-specific cytotoxic T lymphocyte induction by minigene DNA immunization, *Vaccine* 17 [15-16], 2081-8.
- Iwasaki, A.; Torres, C. A.; Ohashi, P. S.; Robinson, H. L. and Barber, B. H. (1997): The dominant role of bone marrow-derived cells in CTL induction following plasmid DNA immunization at different sites, *J Immunol* 159 [1], 11-4.
- Janeway, C. A., Travers, P. et al. (2002): *Immunologie* 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag.
- Jentsch, S. and Schlenker, S. (1995): Selective protein degradation: a journey's end within the proteasome, *Cell* 82 [6], 881-4.
- Joazeiro, C. A. and Weissman, A. M. (2000): RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity, *Cell* 102 [5], 549-52.
- Johnen, H.; Kulbe, H. and Pecher, G. (2001): Long-term tumor growth suppression in mice immunized with naked DNA of the human tumor antigen mucin (MUC1), *Cancer Immunol Immunother* 50 [7], 356-60.
- Johnen, H. and Pecher, G. (2002): Tumor growth inhibition elicited by different vaccines and correlation with antigen specific cytotoxic T-cell frequencies determined by intracellular interferon-gamma staining, *Cancer Lett* 185 [1], 53-9.
- Johnson, E. S.; Bartel, B.; Seufert, W. and Varshavsky, A. (1992): Ubiquitin as a degradation signal, *Embo J* 11 [2], 497-505.
- Johnson, E. S.; Ma, P. C.; Ota, I. M. and Varshavsky, A. (1995): A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal, *J Biol Chem* 270 [29], 17442-56.
- Kalinke, U.; Arnold, B. and Hammerling, G. J. (1990): Strong xenogeneic HLA response in transgenic mice after introducing an alpha 3 domain into HLA B27, *Nature* 348 [6302], 642-4.
- Kim, N. W.; Piatyszek, M. A.; Prowse, K. R.; Harley, C. B.; West, M. D.; Ho, P. L.; Coviello, G. M.; Wright, W. E.; Weinrich, S. L. and Shay, J. W. (1994): Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer, *Science* 266 [5193], 2011-5.
- King, R. W.; Glotzer, M. and Kirschner, M. W. (1996): Mutagenic analysis of the destruction signal of mitotic cyclins and structural characterization of ubiquitinated intermediates, *Mol Biol Cell* 7 [9], 1343-57.
- Kisselev, A. F.; Akopian, T. N.; Castillo, V. and Goldberg, A. L. (1999): Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown, *Mol Cell* 4 [3], 395-402.
- Kisselev, A. F.; Akopian, T. N.; Woo, K. M. and Goldberg, A. L. (1999): The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation, *J Biol Chem* 274 [6], 3363-71.
- Kisselev, A. F.; Garcia-Calvo, M.; Overkleeft, H. S.; Peterson, E.; Pennington, M. W.; Ploegh, H. L.; Thornberry, N. A. and Goldberg, A. L. (2003): The caspase-like sites of proteasomes, their substrate specificity, new inhibitors and substrates, and allosteric interactions with the trypsin-like sites, *J Biol Chem* 278 [38], 35869-77.
- Kisselev, A. F.; Kaganovich, D. and Goldberg, A. L. (2002): Binding of hydrophobic peptides to several non-catalytic sites promotes peptide hydrolysis by all active sites of 20 S proteasomes. Evidence for peptide-induced channel opening in the alpha-rings, *J Biol Chem* 277 [25], 22260-70.
- Kloetzel, P. M. (2001): Antigen processing by the proteasome, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 [3], 179-87.

- Kloetzel, P. M. (2004): Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII, *Nat Immunol* 5 [7], 661-9.
- Knowlton, J. R.; Johnston, S. C.; Whitby, F. G.; Realini, C.; Zhang, Z.; Rechsteiner, M. and Hill, C. P. (1997): Structure of the proteasome activator REGalpha (PA28alpha), *Nature* 390 [6660], 639-43.
- Kobayashi, H.; Terao, T. and Kawashima, Y. (1992): Serum sialyl Tn as an independent predictor of poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer, *J Clin Oncol* 10 [1], 95-101.
- Kovacsovics-Bankowski, M. and Rock, K. L. (1994): Presentation of exogenous antigens by macrophages: analysis of major histocompatibility complex class I and II presentation and regulation by cytokines, *Eur J Immunol* 24 [10], 2421-8.
- Kovacsovics-Bankowski, M. and Rock, K. L. (1995): A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules, *Science* 267 [5195], 243-6.
- Kraft, R.; Kostka, S.; Grelle, G.; Henklein, P.; Kloetzel, P. M. and Kuckelhorn, U. (1998): Influence of single amino acid exchanges in epitope generation by 20S proteasome, *J Protein Chem* 17 [6], 547-8.
- Kubo, R. T.; Sette, A.; Grey, H. M.; Appella, E.; Sakaguchi, K.; Zhu, N. Z.; Arnott, D.; Sherman, N.; Shabanowitz, J.; Michel, H. and et al. (1994): Definition of specific peptide motifs for four major HLA-A alleles, *J Immunol* 152 [8], 3913-24.
- Kuckelkorn, U.; Frentzel, S.; Kraft, R.; Kostka, S.; Groettrup, M. and Kloetzel, P. M. (1995): Incorporation of major histocompatibility complex--encoded subunits LMP2 and LMP7 changes the quality of the 20S proteasome polypeptide processing products independent of interferon-gamma, *Eur J Immunol* 25 [9], 2605-11.
- Lam, Y. A.; DeMartino, G. N.; Pickart, C. M. and Cohen, R. E. (1997): Specificity of the ubiquitin isopeptidase in the PA700 regulatory complex of 26 S proteasomes, *J Biol Chem* 272 [45], 28438-46.
- Lam, Y. A.; Xu, W.; DeMartino, G. N. and Cohen, R. E. (1997): Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome, *Nature* 385 [6618], 737-40.
- Laney, J. D. and Hochstrasser, M. (1999): Substrate targeting in the ubiquitin system, *Cell* 97 [4], 427-30.
- Le Borgne, S.; Mancini, M.; Le Grand, R.; Schleef, M.; Dormont, D.; Tiollais, P.; Riviere, Y. and Michel, M. L. (1998): In vivo induction of specific cytotoxic T lymphocytes in mice and rhesus macaques immunized with DNA vector encoding an HIV epitope fused with hepatitis B surface antigen, *Virology* 240 [2], 304-15.
- Leggett, D. S.; Hanna, J.; Borodovsky, A.; Crosas, B.; Schmidt, M.; Baker, R. T.; Walz, T.; Ploegh, H. and Finley, D. (2002): Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function, *Mol Cell* 10 [3], 495-507.
- Leitner, W. W.; Ying, H. and Restifo, N. P. (1999): DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects, *Vaccine* 18 [9-10], 765-77.
- Li, J.; Post, M.; Volk, R.; Gao, Y.; Li, M.; Metais, C.; Sato, K.; Tsai, J.; Aird, W.; Rosenberg, R. D.; Hampton, T. G.; Sellke, F.; Carmeliet, P. and Simons, M. (2000): PR39, a peptide regulator of angiogenesis, *Nat Med* 6 [1], 49-55.
- Li, X. and Coffino, P. (1992): Regulated degradation of ornithine decarboxylase requires interaction with the polyamine-inducible protein antizyme, *Mol Cell Biol* 12 [8], 3556-62.
- Ligtenberg, M. J.; Buijs, F.; Vos, H. L. and Hilken, J. (1992): Suppression of cellular aggregation by high levels of episialin, *Cancer Res* 52 [8], 2318-24.
- Lin, L.; DeMartino, G. N. and Greene, W. C. (1998): Cotranslational biogenesis of NF-kappaB p50 by the 26S proteasome, *Cell* 92 [6], 819-28.
- Lowe, J.; Stock, D.; Jap, B.; Zwickl, P.; Baumeister, W. and Huber, R. (1995): Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution, *Science* 268 [5210], 533-9.
- Luckey, C. J.; Marto, J. A.; Partridge, M.; Hall, E.; White, F. M.; Lippolis, J. D.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F. and Engelhard, V. H. (2001): Differences in the expression of human class I MHC alleles and their associated peptides in the presence of proteasome inhibitors, *J Immunol* 167 [3], 1212-21.
- Ma, C. P.; Slaughter, C. A. and DeMartino, G. N. (1992): Identification, purification, and characterization of a protein activator (PA28) of the 20 S proteasome (macropain), *J Biol Chem* 267 [15], 10515-23.
- Macagno, A.; Gilliet, M.; Sallusto, F.; Lanzavecchia, A.; Nestle, F. O. and Groettrup, M. (1999): Dendritic cells up-regulate immunoproteasomes and the proteasome regulator PA28 during maturation, *Eur J Immunol* 29 [12], 4037-42.
- Mapara, M. Y. and Sykes, M. (2004): Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance, *J Clin Oncol* 22 [6], 1136-51.
- McCutchen-Maloney, S. L.; Matsuda, K.; Shimbara, N.; Binns, D. D.; Tanaka, K.; Slaughter, C. A. and DeMartino, G. N. (2000): cDNA cloning, expression, and functional characterization of PI31, a proline-rich inhibitor of the proteasome, *J Biol Chem* 275 [24], 18557-65.
- Minev, B.; Hipp, J.; Firat, H.; Schmidt, J. D.; Langlade-Demoyen, P. and Zanetti, M. (2000): Cytotoxic T cell immunity against telomerase reverse transcriptase in humans, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 [9], 4796-801.

- Morel, S.; Levy, F.; Burlet-Schiltz, O.; Brasseur, F.; Probst-Kepper, M.; Peitrequin, A. L.; Monsarrat, B.; Van Velthoven, R.; Cerottini, J. C.; Boon, T.; Gairin, J. E. and Van den Eynde, B. J. (2000): Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells, *Immunity* 12 [1], 107-17.
- Murata, S.; Udono, H.; Tanahashi, N.; Hamada, N.; Watanabe, K.; Adachi, K.; Yamano, T.; Yui, K.; Kobayashi, N.; Kasahara, M.; Tanaka, K. and Chiba, T. (2001): Immunoproteasome assembly and antigen presentation in mice lacking both PA28alpha and PA28beta, *Embo J* 20 [21], 5898-907.
- Nakamori, S.; Ota, D. M.; Cleary, K. R.; Shirotani, K. and Irimura, T. (1994): MUC1 mucin expression as a marker of progression and metastasis of human colorectal carcinoma, *Gastroenterology* 106 [2], 353-61.
- Neefjes, J.; Gottfried, E.; Roelse, J.; Gromme, M.; Obst, R.; Hammerling, G. J. and Momburg, F. (1995): Analysis of the fine specificity of rat, mouse and human TAP peptide transporters, *Eur J Immunol* 25 [4], 1133-6.
- Niedermann, G.; Butz, S.; Ihlenfeldt, H. G.; Grimm, R.; Lucchiari, M.; Hoschutsky, H.; Jung, G.; Maier, B. and Eichmann, K. (1995): Contribution of proteasome-mediated proteolysis to the hierarchy of epitopes presented by major histocompatibility complex class I molecules, *Immunity* 2 [3], 289-99.
- Norbury, C. C.; Basta, S.; Donohue, K. B.; Tschärke, D. C.; Princiotto, M. F.; Berglund, P.; Gibbs, J.; Bennink, J. R. and Yewdell, J. W. (2004): CD8+ T cell cross-priming via transfer of proteasome substrates, *Science* 304 [5675], 1318-21.
- Nussbaum, A. K.; Dick, T. P.; Keilholz, W.; Schirle, M.; Stevanovic, S.; Dietz, K.; Heinemeyer, W.; Groll, M.; Wolf, D. H.; Huber, R.; Rammensee, H. G. and Schild, H. (1998): Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [21], 12504-9.
- Oldstone, M. B.; Tishon, A.; Eddleston, M.; de la Torre, J. C.; McKee, T. and Whitton, J. L. (1993): Vaccination to prevent persistent viral infection, *J Virol* 67 [7], 4372-8.
- Ortmann, B.; Copeman, J.; Lehner, P. J.; Sadasivan, B.; Herberg, J. A.; Grandea, A. G.; Riddell, S. R.; Tampe, R.; Spies, T.; Trowsdale, J. and Cresswell, P. (1997): A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes, *Science* 277 [5330], 1306-9.
- Ossendorp, F.; Eggers, M.; Neisig, A.; Ruppert, T.; Groettrup, M.; Sijts, A.; Mengede, E.; Kloetzel, P. M.; Neefjes, J.; Koszinowski, U. and Melief, C. (1996): A single residue exchange within a viral CTL epitope alters proteasome-mediated degradation resulting in lack of antigen presentation, *Immunity* 5 [2], 115-24.
- Ossendorp, F.; Mengede, E.; Camps, M.; Filius, R. and Melief, C. J. (1998): Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors, *J Exp Med* 187 [5], 693-702.
- Papa, F. R.; Amerik, A. Y. and Hochstrasser, M. (1999): Interaction of the Doa4 deubiquitinating enzyme with the yeast 26S proteasome, *Mol Biol Cell* 10 [3], 741-56.
- Pascolo, S.; Bervas, N.; Ure, J. M.; Smith, A. G.; Lemonnier, F. A. and Perarnau, B. (1997): HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knockout mice, *J Exp Med* 185 [12], 2043-51.
- Patnaik, A.; Chau, V. and Wills, J. W. (2000): Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 [24], 13069-74.
- Peters, B.; Janek, K.; Kuckelkorn, U. and Holzthutter, H. G. (2002): Assessment of proteasomal cleavage probabilities from kinetic analysis of time-dependent product formation, *J Mol Biol* 318 [3], 847-62.
- Peters, J. M.; Cejka, Z.; Harris, J. R.; Kleinschmidt, J. A. and Baumeister, W. (1993): Structural features of the 26 S proteasome complex, *J Mol Biol* 234 [4], 932-7.
- Pickart, C. M. (1997): Targeting of substrates to the 26S proteasome, *Faseb J* 11 [13], 1055-66.
- Pickart, C. M. (2004): Back to the future with ubiquitin, *Cell* 116 [2], 181-90.
- Plunkett, T.; Graham, R.; Correa, I.; Sewell, R.; Miles, D.; Burchell, J. and Taylor-Papadimitriou, J. (2004): Protection against MUC1 expressing mouse tumours by intra-muscular injection of MUC1 cDNA requires functional CD8+ and CD4+ T cells but does not require the MUC1 tandem repeat domain, *Int J Cancer* 109 [5], 691-7.
- Princiotto, M. F.; Finzi, D.; Qian, S. B.; Gibbs, J.; Schuchmann, S.; Buttgerit, F.; Bennink, J. R. and Yewdell, J. W. (2003): Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing, *Immunity* 18 [3], 343-54.
- Qian, S. B.; Ott, D. E.; Schubert, U.; Bennink, J. R. and Yewdell, J. W. (2002): Fusion proteins with COOH-terminal ubiquitin are stable and maintain dual functionality in vivo, *J Biol Chem* 277 [41], 38818-26.
- Rammensee, H. G.; Friede, T. and Stevanović, S. (1995): MHC ligands and peptide motifs: first listing, *Immunogenetics* 41 [4], 178-228.
- Redman, K. L. and Rechsteiner, M. (1989): Identification of the long ubiquitin extension as ribosomal protein S27a, *Nature* 338 [6214], 438-40.

- Reinstein, E.; Scheffner, M.; Oren, M.; Ciechanover, A. and Schwartz, A. (2000): Degradation of the E7 human papillomavirus oncoprotein by the ubiquitin-proteasome system: targeting via ubiquitination of the N-terminal residue, *Oncogene* 19 [51], 5944-50.
- Renkvist, N.; Castelli, C.; Robbins, P. F. and Parmiani, G. (2001): A listing of human tumor antigens recognized by T cells, *Cancer Immunol Immunother* 50 [1], 3-15.
- Rock, K. L. and Goldberg, A. L. (1999): Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides, *Annu Rev Immunol* 17, 739-79.
- Rock, K. L.; Gramm, C.; Rothstein, L.; Clark, K.; Stein, R.; Dick, L.; Hwang, D. and Goldberg, A. L. (1994): Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules, *Cell* 78 [5], 761-71.
- Rock, K. L.; York, I. A. and Goldberg, A. L. (2004): Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation, *Nat Immunol* 5 [7], 670-7.
- Rock, K. L.; York, I. A.; Saric, T. and Goldberg, A. L. (2002): Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides, *Adv Immunol* 80, 1-70.
- Rodriguez, F.; An, L. L.; Harkins, S.; Zhang, J.; Yokoyama, M.; Widera, G.; Fuller, J. T.; Kincaid, C.; Campbell, I. L. and Whitton, J. L. (1998): DNA immunization with minigenes: low frequency of memory cytotoxic T lymphocytes and inefficient antiviral protection are rectified by ubiquitination, *J Virol* 72 [6], 5174-81.
- Saric, T.; Chang, S. C.; Hattori, A.; York, I. A.; Markant, S.; Rock, K. L.; Tsujimoto, M. and Goldberg, A. L. (2002): An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides, *Nat Immunol* 3 [12], 1169-76.
- Scherer, D. C.; Brockman, J. A.; Chen, Z.; Maniatis, T. and Ballard, D. W. (1995): Signal-induced degradation of I kappa B alpha requires site-specific ubiquitination, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 [24], 11259-63.
- Schmidtke, G.; Emch, S.; Groettrup, M. and Holzthutter, H. G. (2000): Evidence for the existence of a non-catalytic modifier site of peptide hydrolysis by the 20 S proteasome, *J Biol Chem* 275 [29], 22056-63.
- Schmidtke, G.; Holzthutter, H. G.; Bogyo, M.; Kairies, N.; Groll, M.; de Giuli, R.; Emch, S. and Groettrup, M. (1999): How an inhibitor of the HIV-I protease modulates proteasome activity, *J Biol Chem* 274 [50], 35734-40.
- Schmidtke, G.; Schmidt, M. and Kloetzel, P. M. (1997): Maturation of mammalian 20 S proteasome: purification and characterization of 13 S and 16 S proteasome precursor complexes, *J Mol Biol* 268 [1], 95-106.
- Schubert, U.; Anton, L. C.; Gibbs, J.; Norbury, C. C.; Yewdell, J. W. and Bennink, J. R. (2000): Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes, *Nature* 404 [6779], 770-4.
- Schubert, U.; Ott, D. E.; Chertova, E. N.; Welker, R.; Tessmer, U.; Princiotta, M. F.; Bennink, J. R.; Krausslich, H. G. and Yewdell, J. W. (2000): Proteasome inhibition interferes with gag polyprotein processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 [24], 13057-62.
- Schwarz, K.; van Den Broek, M.; Kostka, S.; Kraft, R.; Soza, A.; Schmidtke, G.; Kloetzel, P. M. and Groettrup, M. (2000): Overexpression of the proteasome subunits LMP2, LMP7, and MECL-1, but not PA28 alpha/beta, enhances the presentation of an immunodominant lymphocytic choriomeningitis virus T cell epitope, *J Immunol* 165 [2], 768-78.
- Seeger, M.; Ferrell, K.; Frank, R. and Dubiel, W. (1997): HIV-1 tat inhibits the 20 S proteasome and its 11 S regulator-mediated activation, *J Biol Chem* 272 [13], 8145-8.
- Seifert, U.; Maranon, C.; Shmueli, A.; Desoutter, J. F.; Wesoloski, L.; Janek, K.; Henklein, P.; Diescher, S.; Andrieu, M.; de la Salle, H.; Weinschenk, T.; Schild, H.; Laderach, D.; Galy, A.; Haas, G.; Kloetzel, P. M.; Reiss, Y. and Hosmalin, A. (2003): An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope, *Nat Immunol* 4 [4], 375-9.
- Serwold, T.; Gonzalez, F.; Kim, J.; Jacob, R. and Shastri, N. (2002): ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum, *Nature* 419 [6906], 480-3.
- Sette, A.; Vitiello, A.; Rehman, B.; Fowler, P.; Nayarsina, R.; Kast, W. M.; Melief, C. J.; Oseroff, C.; Yuan, L.; Ruppert, J. and et al. (1994): The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes, *J Immunol* 153 [12], 5586-92.
- Shaeffer, J. R. and Kania, M. A. (1995): Degradation of monoubiquitinated alpha-globin by 26S proteasomes, *Biochemistry* 34 [12], 4015-21.
- Shepherd, J. C.; Schumacher, T. N.; Ashton-Rickardt, P. G.; Imaeda, S.; Ploegh, H. L.; Janeway, C. A., Jr. and Tonegawa, S. (1993): TAP1-dependent peptide translocation in vitro is ATP dependent and peptide selective, *Cell* 74 [3], 577-84.
- Shimbara, N.; Ogawa, K.; Hidaka, Y.; Nakajima, H.; Yamasaki, N.; Niwa, S.; Tanahashi, N. and Tanaka, K. (1998): Contribution of proline residue for efficient production of MHC class I ligands by proteasomes, *J Biol Chem* 273 [36], 23062-71.
- Sijts, A. J.; Ruppert, T.; Rehermann, B.; Schmidt, M.; Koszinowski, U. and Kloetzel, P. M. (2000): Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes, *J Exp Med* 191 [3], 503-14.

- Sijts, A. J.; Standera, S.; Toes, R. E.; Ruppert, T.; Beekman, N. J.; van Veelen, P. A.; Ossendorp, F. A.; Melief, C. J. and Kloetzel, P. M. (2000): MHC class I antigen processing of an adenovirus CTL epitope is linked to the levels of immunoproteasomes in infected cells, *J Immunol* 164 [9], 4500-6.
- Sijts, A.; Sun, Y.; Janek, K.; Kral, S.; Paschen, A.; Schadendorf, D. and Kloetzel, P. M. (2002): The role of the proteasome activator PA28 in MHC class I antigen processing, *Mol Immunol* 39 [3-4], 165-9.
- Soza, A.; Knuehl, C.; Groettrup, M.; Henklein, P.; Tanaka, K. and Kloetzel, P. M. (1997): Expression and subcellular localization of mouse 20S proteasome activator complex PA28, *FEBS Lett* 413 [1], 27-34.
- Spence, J.; Sadis, S.; Haas, A. L. and Finley, D. (1995): A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination, *Mol Cell Biol* 15 [3], 1265-73.
- Spicer, A. P.; Parry, G.; Patton, S. and Gendler, S. J. (1991): Molecular cloning and analysis of the mouse homologue of the tumor-associated mucin, MUC1, reveals conservation of potential O-glycosylation sites, transmembrane, and cytoplasmic domains and a loss of minisatellite-like polymorphism, *J Biol Chem* 266 [23], 15099-109.
- Srivastava, P. K. (1994): Heat shock proteins in immune response to cancer: the Fourth Paradigm, *Experientia* 50 [11-12], 1054-60.
- Stohwasser, R.; Holzhutter, H. G.; Lehmann, U.; Henklein, P. and Kloetzel, P. M. (2003): Hepatitis B virus HBx peptide 116-138 and proteasome activator PA28 compete for binding to the proteasome alpha4/MC6 subunit, *Biol Chem* 384 [1], 39-49.
- Stohwasser, R.; Salzmann, U.; Giesebrecht, J.; Kloetzel, P. M. and Holzhutter, H. G. (2000): Kinetic evidences for facilitation of peptide channelling by the proteasome activator PA28, *Eur J Biochem* 267 [20], 6221-30.
- Stoltze, L.; Schirle, M.; Schwarz, G.; Schroter, C.; Thompson, M. W.; Hersh, L. B.; Kalbacher, H.; Stevanovic, S.; Rammensee, H. G. and Schild, H. (2000): Two new proteases in the MHC class I processing pathway, *Nat Immunol* 1 [5], 413-8.
- Sun, Y.; Sijts, A. J.; Song, M.; Janek, K.; Nussbaum, A. K.; Kral, S.; Schirle, M.; Stevanovic, S.; Paschen, A.; Schild, H.; Kloetzel, P. M. and Schadendorf, D. (2002): Expression of the proteasome activator PA28 rescues the presentation of a cytotoxic T lymphocyte epitope on melanoma cells, *Cancer Res* 62 [10], 2875-82.
- Swallow, D. M.; Gendler, S.; Griffiths, B.; Corney, G.; Taylor-Papadimitriou, J. and Bramwell, M. E. (1987): The human tumour-associated epithelial mucins are coded by an expressed hypervariable gene locus PUM, *Nature* 328 [6125], 82-4.
- Swaminathan, S.; Amerik, A. Y. and Hochstrasser, M. (1999): The Doa4 deubiquitinating enzyme is required for ubiquitin homeostasis in yeast, *Mol Biol Cell* 10 [8], 2583-94.
- Tanahashi, N.; Murakami, Y.; Minami, Y.; Shimbara, N.; Hendil, K. B. and Tanaka, K. (2000): Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis, *J Biol Chem* 275 [19], 14336-45.
- Tanioka, T.; Hattori, A.; Masuda, S.; Nomura, Y.; Nakayama, H.; Mizutani, S. and Tsujimoto, M. (2003): Human leukocyte-derived arginine aminopeptidase. The third member of the oxytocinase subfamily of aminopeptidases, *J Biol Chem* 278 [34], 32275-83.
- Tellam, J.; Sherritt, M.; Thomson, S.; Tellam, R.; Moss, D. J.; Burrows, S. R.; Wiertz, E. and Khanna, R. (2001): Targeting of EBNA1 for rapid intracellular degradation overrides the inhibitory effects of the Gly-Ala repeat domain and restores CD8+ T cell recognition, *J Biol Chem* 276 [36], 33353-60.
- Terrell, J.; Shih, S.; Dunn, R. and Hicke, L. (1998): A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor, *Mol Cell* 1 [2], 193-202.
- Theobald, M.; Ruppert, T.; Kuckelkorn, U.; Hernandez, J.; Haussler, A.; Ferreira, E. A.; Liewer, U.; Biggs, J.; Levine, A. J.; Huber, C.; Koszinowski, U. H.; Kloetzel, P. M. and Sherman, L. A. (1998): The sequence alteration associated with a mutational hotspot in p53 protects cells from lysis by cytotoxic T lymphocytes specific for a flanking peptide epitope, *J Exp Med* 188 [6], 1017-28.
- Thomson, S. A.; Elliott, S. L.; Sherritt, M. A.; Sproat, K. W.; Coupar, B. E.; Scalzo, A. A.; Forbes, C. A.; Ladhams, A. M.; Mo, X. Y.; Tripp, R. A.; Doherty, P. C.; Moss, D. J. and Suhrbier, A. (1996): Recombinant polyepitope vaccines for the delivery of multiple CD8 cytotoxic T cell epitopes, *J Immunol* 157 [2], 822-6.
- Thomson, S. A.; Sherritt, M. A.; Medveczky, J.; Elliott, S. L.; Moss, D. J.; Fernando, G. J.; Brown, L. E. and Suhrbier, A. (1998): Delivery of multiple CD8 cytotoxic T cell epitopes by DNA vaccination, *J Immunol* 160 [4], 1717-23.
- Thrower, J. S.; Hoffman, L.; Rechsteiner, M. and Pickart, C. M. (2000): Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal, *Embo J* 19 [1], 94-102.
- Tobery, T. W. and Siliciano, R. F. (1997): Targeting of HIV-1 antigens for rapid intracellular degradation enhances cytotoxic T lymphocyte (CTL) recognition and the induction of de novo CTL responses in vivo after immunization, *J Exp Med* 185 [5], 909-20.
- Toes, R. E.; Nussbaum, A. K.; Degermann, S.; Schirle, M.; Emmerich, N. P.; Kraft, M.; Laplace, C.; Zwinderman, A.; Dick, T. P.; Muller, J.; Schonfisch, B.; Schmid, C.; Fehling, H. J.; Stevanovic, S.;



- Rammensee, H. G. and Schild, H. (2001): Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products, *J Exp Med* 194 [1], 1-12.
- Tourdot, S.; Scardino, A.; Saloustrou, E.; Gross, D. A.; Pascolo, S.; Cordopatis, P.; Lemonnier, F. A. and Kosmatopoulos, K. (2000): A general strategy to enhance immunogenicity of low-affinity HLA-A2. 1-associated peptides: implication in the identification of cryptic tumor epitopes, *Eur J Immunol* 30 [12], 3411-21.
- Ulmer, J. B.; Donnelly, J. J.; Parker, S. E.; Rhodes, G. H.; Felgner, P. L.; Dwarki, V. J.; Gromkowski, S. H.; Deck, R. R.; DeWitt, C. M.; Friedman, A. and et al. (1993): Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein, *Science* 259 [5102], 1745-9.
- Ulrich, H. D. (2002): Natural substrates of the proteasome and their recognition by the ubiquitin system, *Curr Top Microbiol Immunol* 268, 137-74.
- Ureta-Vidal, A.; Firat, H.; Perarnau, B. and Lemonnier, F. A. (1999): Phenotypical and functional characterization of the CD8+ T cell repertoire of HLA-A2.1 transgenic, H-2KbnullDbnull double knockout mice, *J Immunol* 163 [5], 2555-60.
- van der Burg, S. H.; Visseren, M. J.; Brandt, R. M.; Kast, W. M. and Melief, C. J. (1996): Immunogenicity of peptides bound to MHC class I molecules depends on the MHC-peptide complex stability, *J Immunol* 156 [9], 3308-14.
- van Endert, P. M.; Riganelli, D.; Greco, G.; Fleischhauer, K.; Sidney, J.; Sette, A. and Bach, J. F. (1995): The peptide-binding motif for the human transporter associated with antigen processing, *J Exp Med* 182 [6], 1883-95.
- van Hall, T.; Sijts, A.; Camps, M.; Offringa, R.; Melief, C.; Kloetzel, P. M. and Ossendorp, F. (2000): Differential influence on cytotoxic T lymphocyte epitope presentation by controlled expression of either proteasome immunosubunits or PA28, *J Exp Med* 192 [4], 483-94.
- Varshavsky, A. (1992): The N-end rule, *Cell* 69 [5], 725-35.
- Varshavsky, A. (1996): The N-end rule: functions, mysteries, uses, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 [22], 12142-9.
- Vasilakos, J. P. and Michael, J. G. (1993): Herpes simplex virus class I-restricted peptide induces cytotoxic T lymphocytes in vivo independent of CD4+ T cells, *J Immunol* 150 [6], 2346-55.
- Velders, M. P.; Weijzen, S.; Eiben, G. L.; Elmishad, A. G.; Kloetzel, P. M.; Higgins, T.; Ciccarelli, R. B.; Evans, M.; Man, S.; Smith, L. and Kast, W. M. (2001): Defined flanking spacers and enhanced proteolysis is essential for eradication of established tumors by an epitope string DNA vaccine, *J Immunol* 166 [9], 5366-73.
- Verma, R.; Aravind, L.; Oania, R.; McDonald, W. H.; Yates, J. R., 3rd; Koonin, E. V. and Deshaies, R. J. (2002): Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome, *Science* 298 [5593], 611-5.
- Vitiello, A.; Marchesini, D.; Furze, J.; Sherman, L. A. and Chesnut, R. W. (1991): Analysis of the HLA-restricted influenza-specific cytotoxic T lymphocyte response in transgenic mice carrying a chimeric human-mouse class I major histocompatibility complex, *J Exp Med* 173 [4], 1007-15.
- Vonderheide, R. H.; Hahn, W. C.; Schultze, J. L. and Nadler, L. M. (1999): The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes, *Immunity* 10 [6], 673-9.
- Weissman, A. M. (2001): Themes and variations on ubiquitylation, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 [3], 169-78.
- Wesseling, J.; van der Valk, S. W.; Vos, H. L.; Sonnenberg, A. and Hilken, J. (1995): Episialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components, *J Cell Biol* 129 [1], 255-65.
- Whitton, J. L.; Sheng, N.; Oldstone, M. B. and McKee, T. A. (1993): A "string-of-beads" vaccine, comprising linked minigenes, confers protection from lethal-dose virus challenge, *J Virol* 67 [1], 348-52.
- Wild, J.; Grusby, M. J.; Schirmbeck, R. and Reimann, J. (1999): Priming MHC-I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to exogenous hepatitis B surface antigen is CD4+ T cell dependent, *J Immunol* 163 [4], 1880-7.
- Wilkinson, K. D. (1997): Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes, *Faseb J* 11 [14], 1245-56.
- Wilkinson, K. D. (2000): Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome, *Semin Cell Dev Biol* 11 [3], 141-8.
- Wolff, J. A.; Ludtke, J. J.; Acsadi, G.; Williams, P. and Jani, A. (1992): Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle, *Hum Mol Genet* 1 [6], 363-9.
- Wolff, J. A.; Malone, R. W.; Williams, P.; Chong, W.; Acsadi, G.; Jani, A. and Felgner, P. L. (1990): Direct gene transfer into mouse muscle in vivo, *Science* 247 [4949 Pt 1], 1465-8.
- Yao, T. and Cohen, R. E. (2002): A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome, *Nature* 419 [6905], 403-7.
- Ye, M.; Morello, C. S. and Spector, D. H. (2002): Strong CD8 T-cell responses following coimmunization with plasmids expressing the dominant pp89 and subdominant M84 antigens of murine cytomegalovirus correlate with long-term protection against subsequent viral challenge, *J Virol* 76 [5], 2100-12.

- 
- York, I. A.; Chang, S. C.; Saric, T.; Keys, J. A.; Favreau, J. M.; Goldberg, A. L. and Rock, K. L. (2002): The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues, *Nat Immunol* 3 [12], 1177-84.
- Zaiss, D. M.; Standera, S.; Holzhutter, H.; Kloetzel, P. and Sijts, A. J. (1999): The proteasome inhibitor PI31 competes with PA28 for binding to 20S proteasomes, *FEBS Lett* 457 [3], 333-8.
- Zaiss, D. M.; Standera, S.; Kloetzel, P. M. and Sijts, A. J. (2002): PI31 is a modulator of proteasome formation and antigen processing, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 [22], 14344-9.

## 6 ANHANG

### ABKÜRZUNGEN

A	Alanin	m	murin
ABC	ATP binding cassette	MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption / Ionisation
AMC	7-Amido-4-Methylcoumarin	MHC	major histocompatibility complex
Amp	Ampicillin	MIF	mittlere Fluoreszenzintensität
APC	antigen presenting cell	MS	Massenspektrometrie
APS	Ammoniumpersulfat	ODC	Ornithin-Decarboxylase
$\beta_2$ M	$\beta_2$ -Microglobulin	P	Prolin / Position
$\beta$ Na	$\beta$ -Naphthylamid	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
BSA	bovine serum albumin	PBMC	peripheral blood mononuclear cells
Bz-	Benzoyl-	PBS	phosphate buffered saline
CD	cluster of differentiation	PCR	polymerase chain reaction
CMV	Cytomegalievirus	R	Arginin
CTL	cytotoxic T lymphocyte	RA	relative Affinität
D	Glutamat	RP	reversed phase
DAPI	4',6-diamidino-2-Phenylindol	rpm	rounds per minute
DC <sub>50</sub>	dissociation complex 50	Rpn	regulatory particle non ATPase
DEAE	Diethylaminoethanol	Rpt	regulatory particle ATPase
DMF	N,N-Dimethylformamid	RT	Raumtemperatur
DMSO	Dimethylsulfoxid	SDS	sodium dodecyl sulfate
DRiPs	defective ribosomal products	SEB	Staphylococcus Enterotoxin B
DTT	Dithiothreitol	Suc-	Succinyl-
DUBs	deubiquitinierende Enzyme	TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
ECL	enhanced chemiluminescence	TAP	transporter associated with antigen processing
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	TCGF	T cell growth factor
ER	Endoplasmatisches Reticulum	TFA	Trifluoressigsäure
ESI	Elektronenspray-Ionisation	Thr	Threonin
FACS	fluorescence activated cell sorting	TOF	time of flight
FCS	fötales Kälberserum	TPPII	Tripeptidylpeptidase-II
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
FPLC	fast protein liquid chromatography	Tyr	Tyrosin
G	Glycin	U	units
GFP	green fluorescent protein	Ub	Ubiquitin
Glu	Glutamat	UBP	Ubiquitin-prozessierende Protease
h	human / Stunde(n)	UCH	Ubiquitin C-terminale Hydrolase
HHD	human human D <sup>b</sup>	UFD	ubiquitin fusion degradation
HLA	human leukocyte antigen	V	Valin
HPLC	high performance liquid chromatography	VNTR	variable numbers of tandem repeats
hTERT	humane Telomerase Reverse Transkriptase	v/v	volume per volume
IFA	Incomplete Freund's Adjuvant	w/v	weight per volume
IFN	Interferon	WT1	Wilms Tumor 1
IL	Interleukin	Y	Tyrosin
K	Lysin	Z-	Benzyloxycarbonyl-
L	Leucin		
LB	Luria-Bertani-Medium		

## PUBLIKATIONEN

Schmidt M, Glimm H, Wissler M, Hoffmann G, Olsson K, Sellers S, Carbonaro D, Tisdale JF, Leurs C, Hanenberg H, Dunbar CE, Kiem HP, Karlsson S, Kohn DB, Williams D, von Kalle C. Efficient characterization of retro-, lenti- and foamyvector-transduced cell populations by high-accuracy insertion site sequencing. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 May;996:112-21.

Schmidt M, Hoffmann G, Wissler M, Lemke N, Muessig A, Glimm H, Williams DA, Ragg S, Hesemann CU, von Kalle C. Detection and direct genomic sequencing of multiple rare unknown flanking DNA in highly complex samples. *Hum Gene Ther.* 2001 May 1;12(7):743-9.

Schmidt M, Zickler P, Hoffmann G, Wissler M, Glimm H, Wu T, Tisdale J, Kim H, Dunbar C, von Kalle C. The clonal activity of transduced autologous repopulating progenitor cells. Chapter 6, *Autologous Blood and Marrow Transplantation X*. Proceedings of the Tenth International Symposium. Published in May 2001.

Schmidt M, Glimm H, Lemke N, Muessig A, Speckmann C, Haas S, Hoffmann G, von Kalle C. A Model for the Detection of Clonality in Marked Hematopoietic Stem Cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2001 Jun;938:146-55; discussion 155-6.

Schmidt M, Zickler P, Hoffmann G, Haas S, Wissler M, Muessig A, Tisdale JF, Kuramoto K, Andrews RG, Wu T, Kiem HP, Dunbar CE, von Kalle C. Polyclonal long-term repopulating stem cell clones in a primate model. *Blood.* 2002 Oct 15;100(8):2737-43.

## POSTER

Schmidt M, Hoffmann G, Glimm H, Hesemann CU, von Kalle C. Detection and direct genomic sequencing of rare unknown flanking DNA in highly complex samples for the in vivo analysis of retroviral integration sites. *Molecular Therapy* Vol.1, No.5, May 1999. Abstract #944 from the 2nd Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy.

Schmidt M, Zickler P, Hoffmann G, Wissler M, Glimm H, Wu T, Tisdale J, Kim H, Dunbar C, von Kalle C. In vivo integration site analysis in a rhesus macaque model: Detection of polyclonal hematopoietic recovery and individual tracking of marked repopulating cell progeny. *Molecular Therapy* Vol.1, No.5, May 2000. Abstract #50 from the 3rd Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy.

Schmidt M, Zickler P, Wissler M, Hoffmann G, Wu T, Tisdale J, Karlsson S, Dunbar C, von Kalle C. LAM-PCR: Monitoring the clonal composition of the hematopoietic system in transplantation models in vivo. *Blood* Vol.96, No. 11, Nov. 16, 2000. Abstract #2228 from the Forty-Second Annual Meeting of the American Society of Hematology.

Haas S, Hoffmann G, Schmidt M, Speckmann C, Zickler P, Andrews RG, Kiem HP, von Kalle C. Retroviral integration site analysis in the baboon: Semiquantitative longitudinal tracking of vector integration indicates transduction and stable contribution of long-lived pluripotent hematopoietic stem cells. *Molecular Therapy* Vol.3, No.5, May 2001. Abstract #89 from the 4th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy.

## VORTRÄGE

Hoffmann G, Haas S, Schmidt M, Andrews RG, von Kalle C, Kiem HP. Gene transfer into G-CSF/SCF primed marrow cells in the baboon: Retroviral integration site analysis confirms the transduction of long-lived hematopoietic stem cells using a GALV-pseudotype oncoretroviral vector. *Blood* Vol.96, No. 11, Nov. 16, 2000. Abstract #2528 from the 42nd Annual Meeting of the American Society of Hematology.

## DANKSAGUNG

Ich bedanke mich herzlich bei allen Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Peter-Michael Kloetzel für die sehr freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, in der ich unter hervorragenden Bedingungen selbständig arbeiten konnte.

Frau Dr. Gabi Pecher danke ich für die interessante Fragestellung.

Herrn Dr. François Lemonnier möchte ich für die Bereitstellung der transgenen Mäuse und insbesondere die große Hilfe bei der Generierung cytotoxischer T-Zellen danken.

Ich bedanke mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, in deren freundlichem und hilfsbereitem Umfeld ich mich sehr wohl gefühlt habe. Stellvertretend sei Sybille Standera für die Einarbeitung und Hilfe bei technischen Fragen gedankt, sowie Kathrin Textoris-Taube für die massenspektrometrischen Analysen. Britta Strehl, Annett Helfrich und Andrea Schulze gilt mein Dank für das Korrekturlesen der Arbeit.

Für ihre Hilfe bei der Auswertung der in dieser Arbeit nicht vorgestellten kinetischen Daten danke ich Herrn Prof. Hermann-Georg Holzhütter sowie Dr. Björn Peters und Sascha Bulik.

Des weiteren sei dankend auf Herrn Thomas Schirrmann für seine erste Hilfe beim Umgang mit den Mäusen verwiesen.

Nicht zuletzt bin ich sehr dankbar für die Gewährung meiner Promotionsstipendien durch die Charité und die Sonnenfeldstiftung.

**ERKLÄRUNG**

Hiermit versichere ich, die Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Berlin, Juli 2004